



**Bárbara Silva Coelho Síntese e avaliação biológica de porfirinas β -
funcionalizadas**



Bárbara Silva Coelho Síntese e avaliação biológica de porfirinas β -funcionalizadas

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, ramo de Química Orgânica e Produtos Naturais, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria da Graça de Pinho Morgado Silva Neves, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, da Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Nuno Miguel Lalavado Moura, investigador de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria da Graça Pinho Morgado da Silva Neves

Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Marta Piñeiro Gómez

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Coimbra

agradecimentos

Desejo expressar os meus agradecimentos a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Aqui presto-lhes o meu maior reconhecimento:

Aos meus orientadores, Professora Graça Neves, Professora Amparo Faustino e Doutor Nuno Moura, pela orientação científica dada, pela disponibilidade, todo o incentivo e constante ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Artur Silva, pela sua constante disponibilidade, paciência e preciosa ajuda na interpretação dos espetros de RMN.

Ao Dr. Hilário, pela ajuda na aquisição dos espetros de RMN.

Ao grupo de Espetrometria de Massa da Universidade de Aveiro.

Ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro por me proporcionar as condições necessárias para o desenvolvimento desta dissertação.

À Professora Adelaide Almeida e ao Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ambiental, em especial, à Lia Costa e à Inês Linhares.

A todos os meus amigos e colegas. À Rita Acúrcio agradeço pela amizade, carinho, apoio e cumplicidade que não se explica, apenas se vive...

À Ana Teresa Peixoto quero agradecer pela sua incansável disponibilidade, pelo companheirismo, amizade, compreensão e sobretudo por todos os bons momentos partilhados e pelas palavras certas nos momentos certos.

À Joana Ferreira, agradeço a boa disposição, o otimismo e o apoio incondicional, nos bons momentos e também nos mais difíceis.

À Mafalda Pereira pela ternura da sua amizade, conselhos e apoio que me deu ao longo deste ano.

A todos os colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha mãe e ao meu pai por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem nesta longa e difícil caminhada. Quero agradecer-lhes por todo o apoio, paciência, compreensão, carinho e motivação.

Ao Tiago, por toda a força que sempre me deu para chegar ao fim desta etapa. Quero agradecer-lhe por todos os momentos que me proporcionou e principalmente por toda a paciência e compreensão ao longo deste ano.

À Cátia Gama pelas horas infinitas perdidas comigo, pelo apoio incondicional nos meus piores momentos. Também pela alegria, amizade, paciência, motivação e bons momentos partilhados.

palavras-chave

Macrociclos tetrapirrólicos, Funcionalização beta pirrólica, Porfirinas catiónicas, Fotossensibilizadores, Fotoinativação de Microrganismos, Oxigénio Singlete

resumo

Novos métodos alternativos para a destruição de microrganismos patogénicos, devido ao aparecimento recorrente de bactérias multirresistentes a antibióticos, são objeto de uma procura constante.

A presente dissertação teve como principal objetivo a síntese de fotossensibilizadores porfirínicos catiónicos para posterior aplicação na fotoinativação de microrganismos (PDI), uma metodologia que tem sido proposta como potencial alternativa a terapias convencionais (ex: antibióticos). Resumidamente, esta metodologia consiste na combinação de luz visível, de oxigénio molecular e de um fotossensibilizador para induzir o dano celular.

O presente documento é composto por 3 partes distintas.

Na primeira parte são abordadas as principais características de macrociclos porfirínicos tais como as propriedades físico-químicas, metodologias de síntese, reatividade e principais aplicações.

Na segunda parte é apresentado um breve resumo sobre a funcionalização de 2-formil-5,10,15,20-tetra-arilporfirinas, nomeadamente a funcionalização da 2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirina via condensação aldólica. Este estudo envolveu a preparação de três derivados do tipo porfirina-piridina, que posteriormente sofreram cationização, tendo-se obtido os respetivos derivados dicatiónicos. Todos os compostos sintetizados e descritos nesta dissertação, foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , COSY, e quando possível, HSQC e HMBC), espetrometria de massa e espetroscopia de UV-Vis.

Na terceira parte deste trabalho são descritos os resultados obtidos nos estudos da atividade biológica dos novos derivados porfirínicos β -funcionalizados. Previamente foram feitos estudos de geração de oxigénio singlete, sendo possível concluir que os derivados do tipo porfirina-piridina dicatiónicos sintetizados são bons geradores de $^1\text{O}_2$.

Nos estudos de fotoinativação da bactéria Gram-negativa *E. Coli* bioluminescente, os derivados dicatiónicos sintetizados demonstraram ser capazes de inativar esta bactéria.

keywords

Tetrapyrrolic macrocycles, *beta* pyrrolic functionalization, cationic porphyrins, photosensitizers, photoinactivation of microorganisms, singlet oxygen

abstract

New alternatives for the destruction of pathogenic microorganisms are object of search due to the recurrent appearance of multiresistant bacteria to antibiotics. The aim of this dissertation was the synthesis of cationic porphyrins to be used as photosensitizers in photoinactivation of microorganism (PDI), a methodology that has been proposed as potential alternative to conventional therapies (eg: antibiotics). Briefly, this methodology combines visible light, molecular oxygen and a photosensitizer that induce cell damage.

This document is divided into three parts.

In the first part, it is presented a brief introduction considering the porphyrins characteristics, such as, methods of synthesis, reactivity and principal applications.

In the second part it is described a brief resume concerning the functionalization of 2-formyl-5,10,15,20-tetra-arylporphyrins, via aldolic condensation. This study involved the synthesis of three pyridine-porphyrin derivatives and subsequently cationization, yielding the respective dicationic derivatives. All the compounds synthesized during this work were characterized by nuclear magnetic resonance (^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, and when it was possible, HSQC and HMBC), mass spectrometry MALDI and UV-Vis spectroscopy.

In the third part is described the results obtained concerning the biological activity of the new porphyrins β -functionalized. The studies of $^1\text{O}_2$ generation showed that the prepared compounds are able to produce this cytotoxic species. In the studies of photoinactivation of Gram-negative bacteria, the dicationic derivatives have proved to be efficient PS for PDI, inactivating cells of bioluminescent *E. Coli*.

Índice	i
Lista de Abreviaturas	v
Capítulo 1 – Introdução	
1. Introdução	1
1.1. Estrutura e nomenclatura de porfirinas	1
1.2. Propriedades físico-químicas de porfirinas	2
1.3. Derivados porfirínicos – ocorrência natural	6
1.4. Métodos de síntese de porfirinas <i>meso</i> -substituídas simétricas	7
1.5. Reatividade das porfirinas	11
1.5.1. Síntese e estudos de funcionalização de 5,10,15,20-tetra-arilporfirinas via grupo formilo	13
1.6. Aplicações das porfirinas	25
1.6.1 Terapia Fotodinâmica (PDT)	25
1.6.2 Fotoinativação de microrganismos (PDI)	28
 Capítulo 2 – Estudos de síntese de novos derivados catiónicos β-funcionalizados com grupos piridilo	
2. Estudos de síntese de novos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo	35
2.1. Preâmbulo	35
2.2. Reações de condensação do tipo aldol na funcionalização de 2-formil- 5,10,15,20-tetra-arilporfirinas	36
2.3. Síntese de novos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo...	38

2.3.1. Reação de condensação do tipo aldol entre 2-formil-TPP e diferentes acetilpiridinas	38
2.3.2. Estudos de cationização dos derivados do tipo porfirina-piridina 30 ...	59
2.4. Conclusão	63
2.5. Seção Experimental	64
2.5.1. Anotações gerais	64
2.5.2. Procedimento experimental	65
2.5.2.1. <i>Síntese da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP)</i>	65
2.5.2.2. <i>Síntese da 5,10,15,20-tetrafenilporfirinatocobre(II) (TPP-Cu(II))</i>	66
2.5.2.3. <i>Síntese de 2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirina (2-formil-TPP)</i>	66
2.5.2.4. <i>Reação de condensação aldólica da 2-formil-TPP com diferentes acetilpiridinas</i>	67
2.5.2.4.1. <i>Síntese do derivado do tipo porfirina-piridina 30e ...</i>	67
2.5.2.4.2. <i>Síntese dos derivados do tipo porfirina-piridina, 30f e 30g</i>	70
2.5.2.5. <i>Síntese dos derivados catiónicos β-funcionalizados com grupos piridilo, 34e-g</i>	75
 Capítulo 3 – Estudos da atividade biológica de novos derivados catiónicos β-funcionalizados com grupos piridilo	
3. Estudos da atividade biológica de novos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo	79



3.1. Preâmbulo	79
3.2. Avaliação da atividade fotodinâmica dos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo em <i>Escherichia Coli</i> bioluminescente	80
3.2.1. Estudos de geração de oxigénio singlete dos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo	81
3.2.2 Estudos de fotoinativação da bactéria <i>E. Coli</i> na presença dos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo	83
3.3. Conclusão	86
3.4. Seção Experimental	87
3.4.1. Anotações gerais	87
3.4.2. Procedimento geral	87
3.4.2.1. <i>Determinação da produção de oxigénio singlete dos derivados catiónicos β-funcionalizados com grupos piridilo</i>	87
3.4.2.2. <i>Estudos de fotoinativação dos derivados catiónicos β-funcionalizados com grupos piridilo</i>	88

Capítulo 4 – Bibliografia

4. Bibliografia	91
-----------------------	----

Capítulo 5 – Anexos

5. Anexos	99
-----------------	----

$^1\text{O}_2$	Oxigénio singlete
$^3\text{O}_2$	Oxigénio molecular no estado fundamental tripleto
CC	Controlo claro
CE	Controlo escuro
COSY	Espectro bidimensional de correlação espectroscópica homonuclear
d	Dupleto
Da	Dalton
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DDQ	2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona
DFiBF	1,3-difenilisobenzofurano
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dt	Duplo tripleto
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Emissão de fluorescência
FDA	Food and Drug Administration
FMNH₂	Mononucleotídeo de flavina reduzido
Gram-(-)	Gram-negativas
Gram-(+)	Gram-positivas

H-<i>m,p</i>-Ph	Protões <i>meta</i> e <i>para</i> do grupo fenilo das posições <i>meso</i> do macrociclo porfirínico
HMBC	Correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância
H-<i>o</i>-Ph	Protões <i>orto</i> do grupo fenilo das posições <i>meso</i> do macrociclo porfirínico
HSQC	Correlação espectroscópica heteronuclear
HSV-1	<i>Herpes simplex tipo I</i>
hν	Luz
H-β	Protões <i>beta</i> -pirrólicos
ISC	Cruzamento Intersistemas
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LB	Luria Bertani agar
LPS	Lipopolissacarídeos
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MALDI	Desadsorção por Laser Assistida por Matriz
MS	Espetrometria de massa
MW	Microondas
nm	Nanómetros
P	Emissão de fosforescência
PBS	Tampão fosfato salino



PDI	Fotoinativação de microrganismos
PDT	Terapia Fotodinâmica
ppm	Partes por milhão
P-P-Q	Porfirina-porfirina-quinona
PS	Fotossensibilizador
R_f	Fator de retardamento
RMN	Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³C	Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹H	Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de próton
ROS	Espécies reativas de oxigénio
s	Singuleto
S₀	Estado fundamental de singuleto
S_n	Estado excitado de maior energia
t.a	Temperatura ambiente
Tetra-Py⁺-Me	5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetraidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina
TMS	Tetrametilsilano
TPP	5,10,15,20-tetrafenilporfirina
TPP-Cu(II)	5,10,15,20-tetrafenilporfirinatocobre(II)

TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo Triptona de Soja
UV-Vis	Espetroscopia de Ultravioleta-Visível
δ	Desvio químico
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda para os máximos de absorvência



CAPÍTULO 1

– *Introdução* –

1. Introdução

Os compostos porfirínicos já demonstraram as suas potencialidades em diversas áreas científicas, nomeadamente na medicina, em que a terapia fotodinâmica (PDT) e a fotoinativação de microrganismos (PDI) surgem como técnicas bastante promissoras. Nos últimos anos, a comunidade científica tem-se focado no desenvolvimento de novos métodos, de forma a converter estes compostos em derivados com características estruturais e espectroscópicas adequadas para posterior aplicação em PDT e PDI. Neste primeiro capítulo, serão abordadas as principais características desta classe de macrociclos tais como propriedades físico-químicas, metodologias de síntese, reatividade e principais aplicações.

1.1. Estrutura e nomenclatura de porfirinas

As porfirinas são macrociclos constituídos por quatro unidades de tipo pirrol ligadas entre si por quatro pontes metínicas (**Figura 1**). Atualmente o sistema de nomenclatura mais utilizado para designar este tipo de compostos tem por base o sistema proposto pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). No entanto, nalgumas publicações ainda se recorre à nomenclatura trivial proposta por Hans Fischer.^{1,2} No sistema proposto pelo investigador alemão*, os quatro anéis de tipo pirrólicos são designados pelas letras A, B, C e D e as posições externas destes anéis, muitas vezes designados por posições β -pirrólicas, são numerados de 1 a 8. As quatro pontes metínicas que ligam as unidades de tipo pirrol são designadas pelas letras gregas alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ) e normalmente são referidas como posições *meso* (**Figura 1A**).² Na nomenclatura proposta pela IUPAC todos os átomos do núcleo porfirínico, incluindo os nitrogénios são numerados de 1 a 24; nesta numeração as posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 correspondem às posições β -pirrólicas e as posições 5, 10, 15 e 20 às posições *meso*. Os hidrogénios ligados aos átomos de nitrogénio, por convenção, encontram-se no N-21 e N-23 (**Figura 1B**).²

* Hans Fischer, laureado com o Prémio Nobel da Química, em 1930, e considerado um dos pioneiros no estudo de derivados porfirínicos com ocorrência natural.

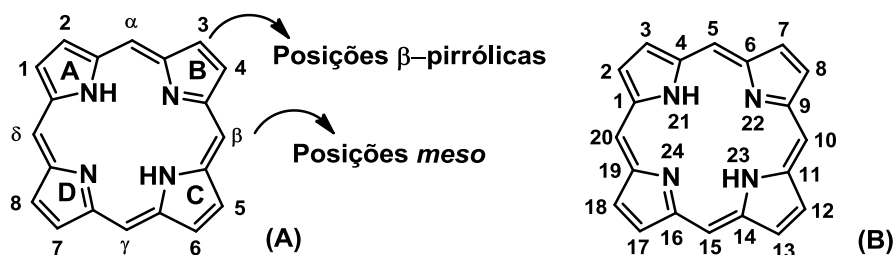


Figura 1. Numeração do núcleo porfirínico: (A) Nomenclatura proposta por Hans Fischer; (B) Nomenclatura proposta pela IUPAC.²

1.2. Propriedades físico-químicas de porfirinas

O macrociclo porfirínico pode apresentar uma ou duas unidades pirrólicas reduzidas e dependendo do grau de redução e da posição relativa dessas unidades toma a designação de clorina, bacterioclorigina e isobacterioclorigina (**Figura 2**). Deste modo, todos os anéis do núcleo porfirínico possuem apenas átomos de carbono com hibridação sp^2 , enquanto as clorinas são caracterizadas por apresentarem um dos anéis pirrólicos com dois centros sp^3 e as bacteriocloriginas e as isobacteriocloriginas são caracterizadas por apresentarem dois dos anéis pirrólicos com dois centros sp^3 cada. Nas bacteriocloriginas estes centros apresentam-se em posições opostas, enquanto nas isobacteriocloriginas estes encontram-se em posições adjacentes.^{1,2}

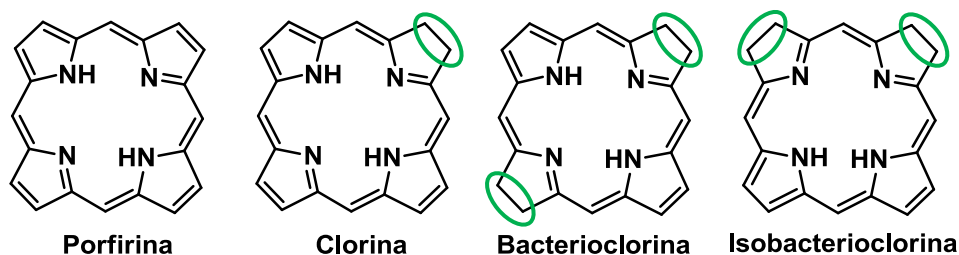


Figura 2. Estrutura do núcleo porfirínico e das suas respetivas formas reduzidas.

Uma das características mais importantes das porfirinas é a sua aromaticidade. Apesar, do núcleo porfirínico possuir um total de 22 eletrões π conjugados, que satisfaz a regra de Hückel ($4n+2$, em que n é igual a 5), apenas 18 ($n=4$) deles participam diretamente no processo de deslocalização eletrónica (**Figura 3**). Portanto, tanto nos

derivados clorina (20 eletrões π) como bacterioclorina e isobacterioclorina (18 eletrões π), o caráter aromático mantém-se.²

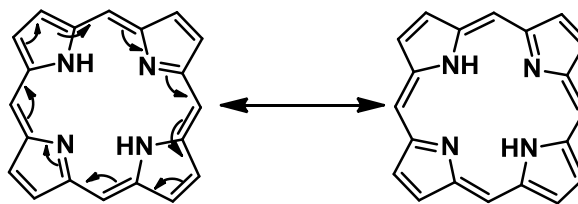


Figura 3. Processo de deslocalização do macrociclo tetrapirrólico.

O caráter aromático destes núcleos porfirínicos pode ser também comprovado facilmente por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a presença do sistema altamente conjugado de eletrões π por espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis). Nos espectros de RMN de ^1H os sinais gerados pela ressonância dos prótons internos NH surgem a desvios químicos muito elevados (δ entre -2 e -4 ppm), devido à forte blindagem que estes prótons sofrem por parte da corrente eletrónica gerada pelos eletrões π deslocalizados. Por outro lado, os sinais gerados pela ressonância dos prótons periféricos *meso* e β -pirrólicos surgem a desvios químicos significativamente mais baixos (δ 10-11 ppm e δ 8-9 ppm, respetivamente), devido à desproteção provocada por essa mesma corrente no exterior do macrociclo.^{1,2} Relativamente aos derivados reduzidos, a presença de um menor número de ligações duplas relativamente ao macrociclo porfirínico conduz a uma diminuição do fluxo eletrónico, o que provoca um aumento do desvio químico para o sinal gerado pela ressonância dos prótons internos NH e uma diminuição do desvio químico para os sinais gerados pela ressonância dos prótons *meso* e β -pirrólicos.¹

A presença do sistema altamente conjugado de eletrões π é também responsável por uma outra característica bastante importante dos derivados porfirínicos – as cores que estes apresentam. De facto, a análise dos espectros de absorção permite obter informações sobre a sua estrutura e potenciais alterações estruturais induzidas na periferia ou no interior do macrociclo.²

O espectro de absorção típico das porfirinas apresenta uma banda de absorção bastante intensa a aproximadamente 400 nm, designada de banda *Soret*. Estes compostos, apresentam ainda, entre 450 e 700 nm, duas ou quatro bandas de absorção de menor

intensidade, denominadas por bandas Q (**Figura 4**).^{1,2} A banda *Soret* é originada pelas transições $\pi\text{-}\pi^*$, refletindo a presença dos 18 elétrons π deslocalizados, responsáveis pelo caráter aromático. Por outro lado, o número e intensidade relativa das bandas Q podem ser relacionados, no caso de macrociclos tetrapirrólicos não complexados, com os substituintes presentes nas posições *meso* e β -pirrólicas, ou no caso de metaloporfirinas, com a estabilidade do ião metálico central.

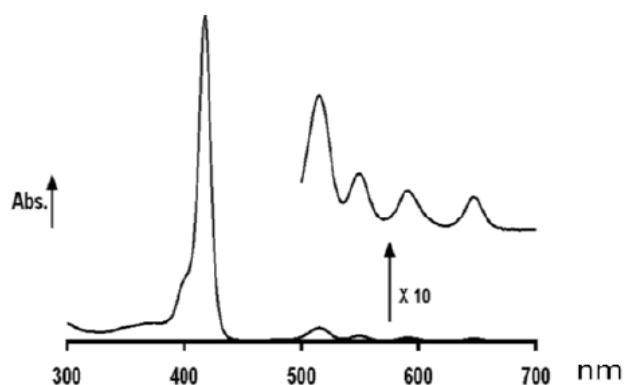


Figura 4. Espectro de absorção típico de uma *meso*-tetra-arilporfirina na forma de base livre.³

De um modo geral, as porfirinas na forma de base livre apresentam quatro bandas Q que são designadas de IV, III, II, I, e consoante a relação de intensidade entre elas, os espectros são designados de: tipo *etio* ($\text{IV} > \text{III} > \text{II} > \text{I}$), tipo *rhodo* ($\text{III} > \text{IV} > \text{II} > \text{I}$), tipo *oxorhodo* ($\text{III} > \text{II} > \text{IV} > \text{I}$) ou do tipo *phyllo* ($\text{IV} > \text{II} > \text{III} > \text{I}$) (**Figura 5**).¹

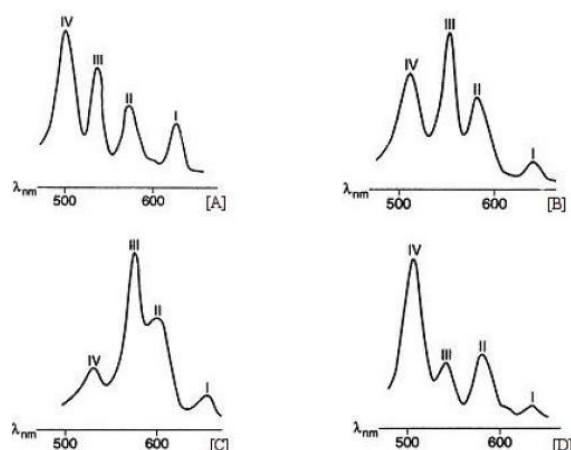


Figura 5. Espectro de absorção da região das bandas Q de porfirinas na forma de base livre: tipo *etio* (A), tipo *rhodo* (B), tipo *oxorhodo* (C) e tipo *phyllo* (D).¹



Quando os macrociclos porfirínicos se encontram complexados no seu interior com iões metálicos, há uma maior simetria estrutural que se traduz na simplificação do espetro de absorção. Em geral, estes passam a apresentar apenas duas bandas Q entre os 500 e os 700 nm, designadas de α e β , e conhecendo a sua intensidade relativa é possível ter uma ideia da estabilidade do complexo (**Figura 6**).² A análise de uma vasta gama de espetros de metaloporfirinas permitiu verificar que nos complexos metálicos mais estáveis a banda α é mais intensa que a β .²

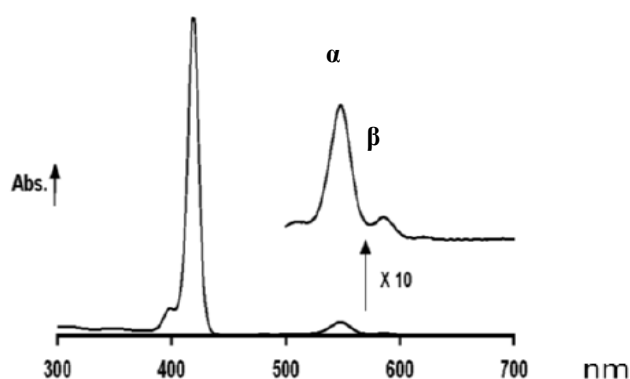


Figura 6. Espetro de absorção típico de uma *meso*-tetra-arilporfirina complexada.³

Os espetros de absorção dos derivados reduzidos apresentam diferenças significativas relativamente aos das porfirinas, nomeadamente em relação à intensidade relativa das bandas Q. Desta forma, a espectroscopia de UV-Vis é uma das técnicas geralmente utilizada para a identificação deste tipo de compostos, sendo possível distinguir porfirinas (**I**), clorinas (**II**), bacterioclorinas (**III**) e isobacterioclorinas (**IV**) entre si (**Figura 7**). Nas clorinas a banda Q que surge a maior comprimento de onda na região dos 650 nm, surge com maior intensidade quando comparada com as porfirinas. No caso de bacterioclorinas esta banda apresenta uma intensidade superior à das porfirinas e mesmo à das clorinas, surgindo deslocada para a região dos 750 nm. Em relação ao espetro de absorção de isobacterioclorinas, este apresenta três bandas Q de intensidade crescente na região dos 500-600 nm, seguidas de uma banda, de intensidade reduzida, a comprimentos de onda superiores.^{1,2}

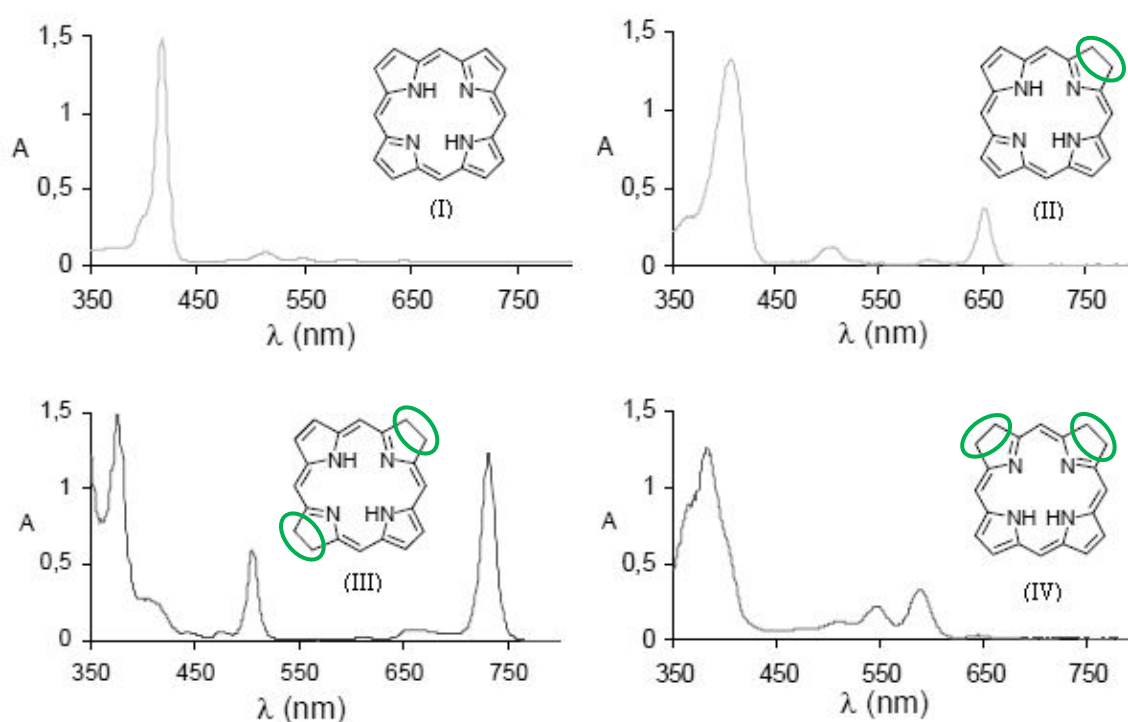


Figura 7. Espectros de absorção típicos de porfirinas e análogos reduzidos: porfirinas **I**, clorinas **II**, bacterioclorinas **III** e isobacterioclorinas **IV**.⁴

1.3. Derivados porfirínicos – ocorrência natural

As porfirinas e os seus derivados análogos, estão presentes em estruturas biológicas de importância vital para uma grande variedade de organismos vivos. Dentro dos derivados porfirínicos destaca-se o grupo heme presente em hemoproteínas (**Figura 8A**) e as clorofilas (**Figura 8B**). O grupo heme presente em hemoproteínas consiste no complexo de ferro(II) da protoporfirina IX e está associado a estruturas como a da hemoglobina e mioglobina responsáveis, respetivamente, pelo transporte e armazenamento de oxigénio molecular nas células animais, enquanto as clorofilas estão relacionadas com os processos fotossintéticos das plantas. Nestas últimas, a estrutura base trata-se de um derivado reduzido de tipo clorina, que se encontra coordenada com um ião magnésio.²

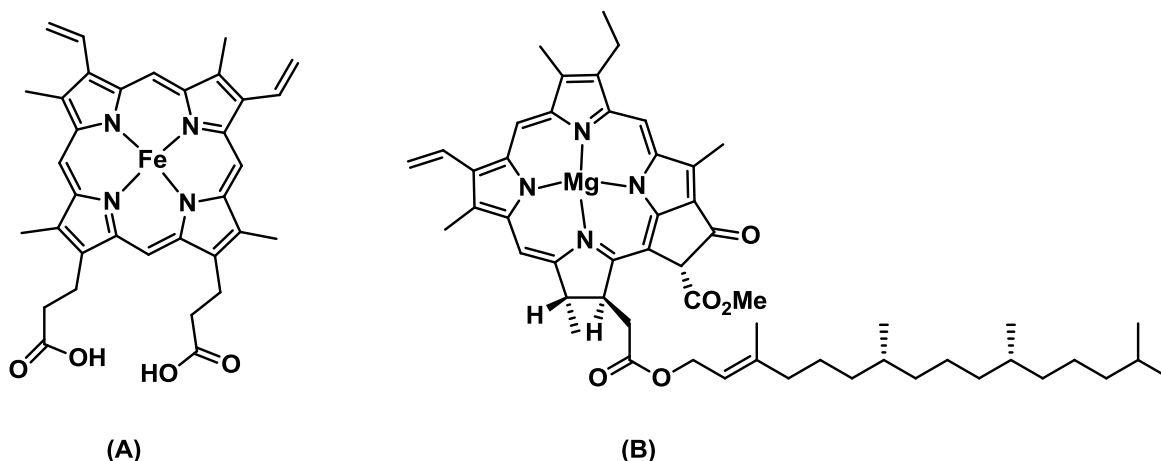


Figura 8. Estrutura de macrociclos tetrapirrólicos naturais envolvidos em processos biológicos: (A) grupo heme presente em hemoproteínas (B) clorofilas.

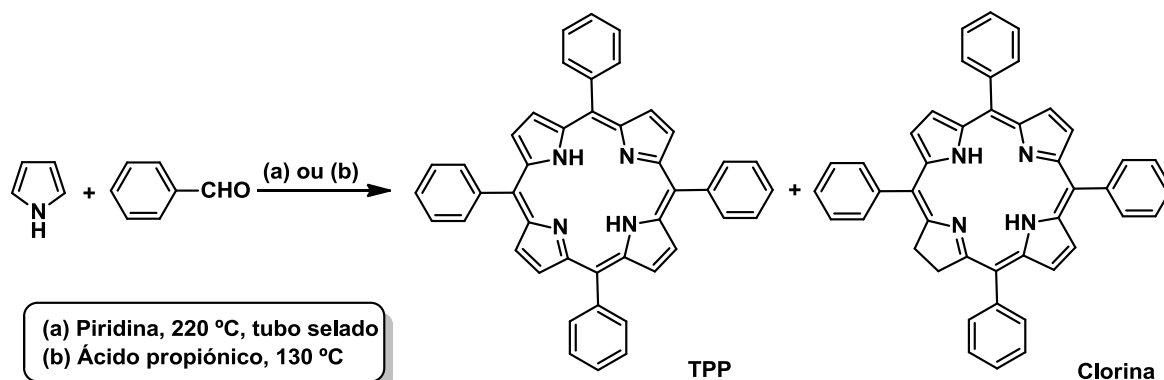
Os macrociclos porfirínicos podem ser isolados a partir de compostos naturais ou podem ser obtidos por via sintética. Uma vez que nesta dissertação as 5,10,15,20-tetra-*aril*porfirinas são utilizadas como precursoras para novas funcionalizações, serão apresentados alguns métodos de síntese para este tipo de macrociclos.

1.4. Métodos de síntese de porfirinas *meso*-substituídas simétricas

A primeira síntese de uma porfirina substituída nas posições *meso*, como é o caso da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP), foi realizada por Rothmund em 1936.⁵ O método consistia no aquecimento de pirrol com benzaldeído, em piridina, a 220 °C durante 48 horas em condições anaeróbias (**Esquema 1a**). Contudo, os rendimentos obtidos eram muito baixos, normalmente inferiores a 5% e as porfirinas sintetizadas por este método encontravam-se contaminadas com a respetiva clorina.^{5,6}

Os baixos rendimentos obtidos pela metodologia descrita por Rothmund levaram a que Adler e Longo desenvolvessem um novo procedimento para preparar *meso*-tetra-*aril*porfirinas. Este novo método consistia na condensação de pirrol com benzaldeído em meio ácido a refluxo (ácido propiónico) e em condições aeróbicas, durante 30 minutos. Com estas condições foi possível obter a TPP com um rendimento de 20% de forma rápida

e reprodutível.^{7,8} Contudo, esta nova rota sintética continuava a apresentar o mesmo problema do procedimento proposto por Rothemund, em que a porfirina obtida se encontrava contaminada com a respetiva clorina (**Esquema 1b**).^{7,8}

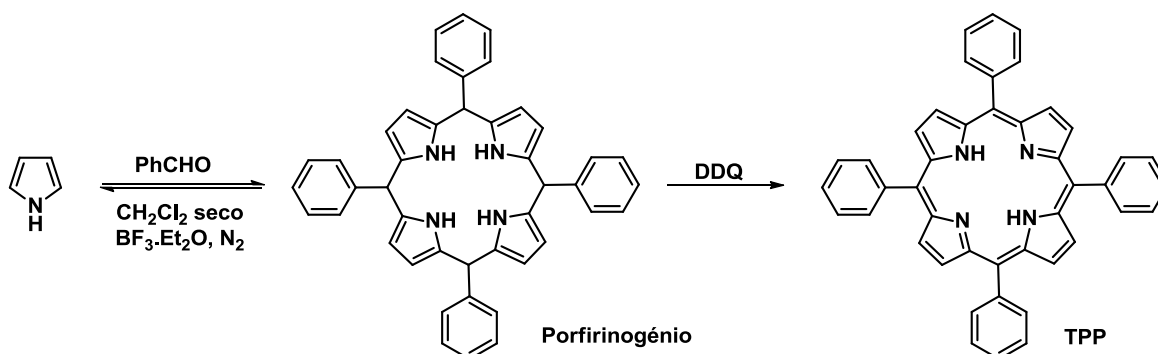


Esquema 1.

De forma a ultrapassar este problema, a mistura da porfirina contaminada com clorina era posteriormente tratada com uma quinona, mais especificamente com 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ), que oxidava a clorina à correspondente porfirina.⁹

Uma abordagem diferente para a síntese deste tipo de compostos foi introduzida por Lindsey¹⁰ e Gonsalves.¹¹ Os autores baseavam-se no facto da formação do porfirinogénio ser termodinamicamente favorável quando o pirrol reage com o aldeído em condições apropriadas. Nesta abordagem a síntese processa-se em dois passos distintos em que o primeiro envolvia a formação do porfirinogénio e o segundo a oxidação deste à respetiva porfirina. Na metodologia proposta por Lindsey,¹⁰ a formação do porfirinogénio envolve a reação de condensação do pirrol com aldeído em diclorometano, à temperatura ambiente sob atmosfera de azoto, durante 30 a 60 minutos, na presença de quantidades catalíticas de ácido trifluoroacético (TFA) ou de trifluoreto de boro (BF₃.OEt₂). Subsequentemente ocorre a oxidação do porfirinogénio à porfirina correspondente pela adição da quantidade estequiométrica de um agente oxidante, DDQ ou *p*-cloranil, com recurso a aquecimento. Este método permite a obtenção de TPP com um rendimento de 30-40%, livre da correspondente clorina (**Esquema 2**).¹⁰ Na abordagem proposta por Gonsalves,¹¹ a primeira fase consiste na reação de condensação do pirrol com o aldeído numa solução de

tetracloreto de carbono (CCl_4) e na presença de um catalisador ácido, o TFA, em atmosfera inerte. O porfirinogénio formado é posteriormente oxidado à respetiva porfina fotoquimicamente ou quimicamente pela adição de uma quantidade estequiométrica de DDQ ou *p*-cloranil.

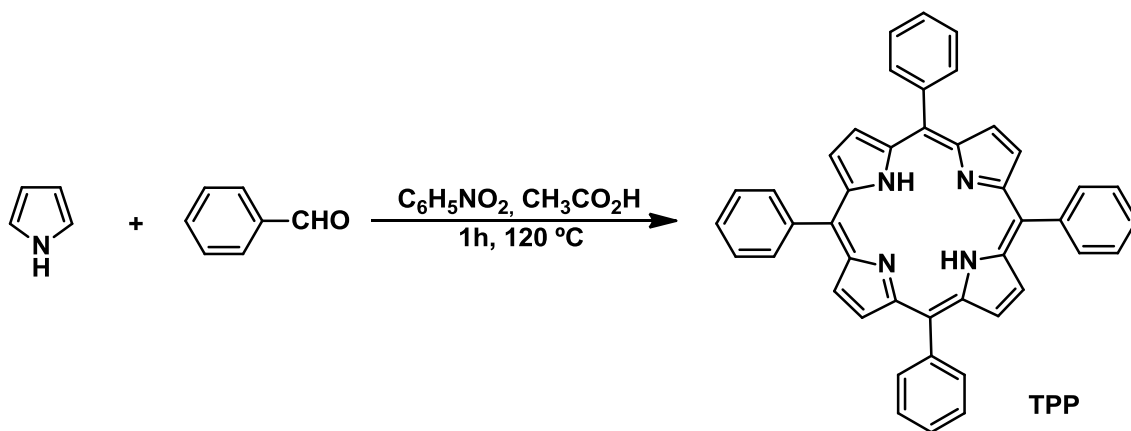


Esquema 2.

De facto, o método proposto por Lindsey foi considerado um avanço na síntese de macrociclos *meso*-substituídos relativamente às condições reacionais propostas por Adler, uma vez que permitiu aumentar o número de aldeídos passíveis de serem utilizados na preparação de porfirinas *meso*-substituídas. Dado tratar-se de um procedimento com condições muito mais suaves que os propostos por Adler ou Rothemund, este procedimento apresenta algumas desvantagens, destacando-se os custos inerentes à utilização de elevadas quantidades de quinona e o dispendioso processo de purificação necessário para isolar a porfina sintetizada.

Mais tarde, em 1991, Rocha Gonsalves e colaboradores¹² propuseram uma nova metodologia que apresentava melhorias relativamente ao procedimento proposto por Adler e Longo. Estes autores demonstraram a possibilidade de sintetizar porfirinas *meso*-tetra-*aril*substituídas com melhores rendimentos, nomeadamente a TPP, num único passo, eliminando o problema de contaminação com a respetiva clorina. O método baseia-se na condensação de pirrol e o benzaldeído numa mistura de ácido acético ou ácido propiónico com 30% de nitrobenzeno, a 120 °C durante 1h e em condições aeróbicas (**Esquema 3**).¹² Nesta reação, o nitrobenzeno atua como um agente oxidante do porfirinogénio originando,

num único passo, as porfirinas desejadas com elevada eficiência sem contaminação com a correspondente clorina.



Esquema 3.

O conhecimento de que o porfirinogénio é eficientemente oxidado pela mistura ácido acético ou propiónico/nitrobenzeno, com formação da respetiva porfirina, introduziu um novo impulso na síntese destes macrociclos, uma vez que dispensa não só a utilização de quinonas de custos elevados bem como a obtenção do macrociclo porfirínico é facilitada.

Mais recentemente, o desenvolvimento e aplicação de fontes de energia alternativas em síntese orgânica, como a irradiação por microondas, tem vindo a assumir um grande destaque.^{13,14} A utilização deste tipo de aquecimento para a síntese de porfirinas tem surgido como uma alternativa face às reações em condições clássicas, facto que pode ser comprovado através do elevado número de publicações em que é utilizada esta técnica. As principais vantagens são: i) redução dos tempos de reação, ii) facilidade em atingir temperaturas elevadas e iii) aumento significativo do rendimento dos produtos das reações e da reprodutibilidade das mesmas.¹³

1.5. Reatividade das porfirinas

Uma linha de investigação sempre atual e inovadora e que continua a fomentar o atual interesse da comunidade científica está relacionada com os estudos de reatividade e funcionalização dos derivados porfirínicos.

Como já foi referido anteriormente, os macrociclos são compostos aromáticos e por isso podem sofrer reações típicas de substituição aromática eletrofílica, tais como, nitração, halogenação, formilação, sulfonação, alquilação e acilação.¹⁵ No entanto, estes compostos ainda podem participar em reações de substituição aromática nucleofílica, de redução, de oxidação, de ciclo-adição, entre outras.¹⁵ Nesta dissertação será dado especial ênfase, às reações que envolvem a introdução do grupo formilo na posição β -pirrólica de *meso*-tetra-*aril*porfirinas e aos estudos de funcionalização envolvendo este mesmo grupo.

De um modo geral, estes macrociclos podem sofrer transformações tanto no interior do anel (átomos de azoto) como nas posições periféricas (*meso* e β -pirrólicas), em que a ativação de uma ou de outra destas posições é conseguida através da modelação da eletronegatividade do macrociclo.

Relativamente às transformações que ocorrem nas posições periféricas do macrociclo, sabe-se que as posições *meso* e β -pirrólicas apresentam reatividades diferentes, sendo que as primeiras são eletronicamente mais reativas do que as segundas. Segundo Woodward, as subunidades pirrólicas tentam atingir um estado de sexteto eletrónico de modo a manterem-se independentes da conjugação do macrociclo. De acordo com esta consideração, os núcleos porfirínicos na forma livre apresentam uma distribuição eletrónica onde as posições *meso* se encontram “carregadas” positivamente (**Figura 9**).²

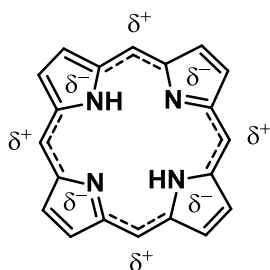


Figura 9. Representação da distribuição eletrónica do macrociclo porfirínico segundo Woodward.²

As transformações internas são, maioritariamente, promovidas pelos átomos de azoto das unidades pirrólicas, que participam facilmente em reações de ácido-base e de complexação com metais de coordenação. Os macrociclos na forma de base livre contêm dois grupos *NH* ligeiramente ácidos e dois átomos de azoto que apresentam caráter básico. Em meio ácido estes átomos são facilmente protonados, originando espécies mono e/ou dicatiónicas, enquanto em meio alcalino a desprotonação dos grupos *NH* dá origem a espécies di-aniónicas (**Figura 10**).¹⁶ Este caráter ácido-base é influenciado pelos grupos substituintes presentes na periferia do macrociclo.

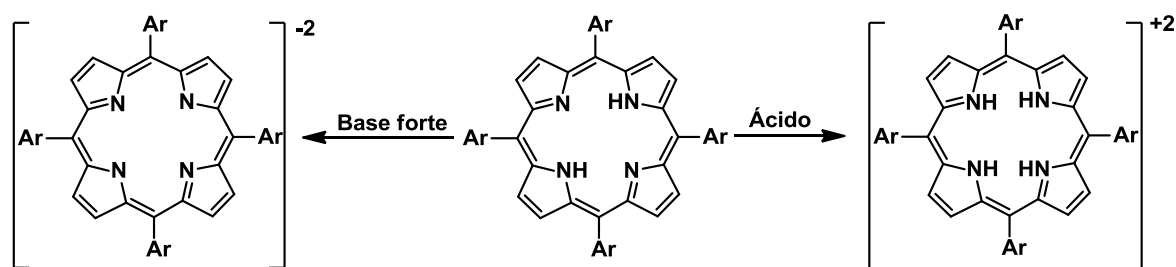


Figura 10. Propriedades ácido-base do macrociclo tetrapirrólico.

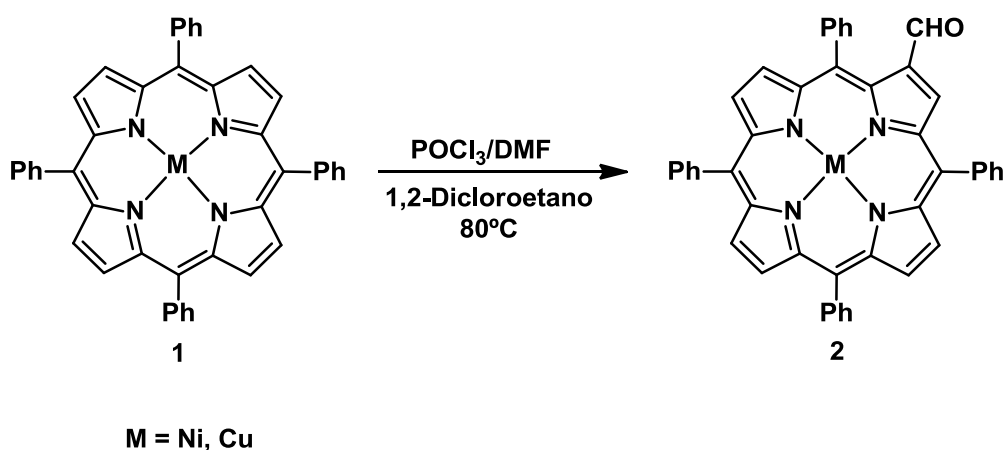
Uma outra reação que pode ocorrer no interior do macrociclo é a reação de complexação, em que os átomos de azoto internos são capazes de coordenar com uma grande variedade de metais, como cobre(II), níquel(II) ou zinco(II), formando metaloporfirinas, como já foi referido anteriormente.

A formação de complexos metálicos é considerada bastante importante, uma vez que não só permite a proteção dos átomos de azoto internos relativamente ao ataque de espécies eletrofílicas ou de bases fortes, como também induz alterações significativas na reatividade do macrociclo face à sua forma de base livre. A utilização de metais de baixa eletronegatividade, por exemplo cobre(II) e níquel(II), torna o macrociclo mais rico em eletrões, aumentando a densidade eletrónica na periferia, o que propicia a utilização destes complexos em reações de substituição aromática eletrofílica. Por outro lado, a complexação utilizando metais com elevada eletronegatividade, por exemplo, Fe(III) e Sn(IV), provoca o efeito oposto favorecendo as reações de substituição aromática

nucleofílica e inibindo de certa forma, a possibilidade de reações na periferia do macrociclo.¹⁷

1.5.1. Síntese e estudos de funcionalização de 5,10,15,20-tetra-arilporfirinas via grupo formilo

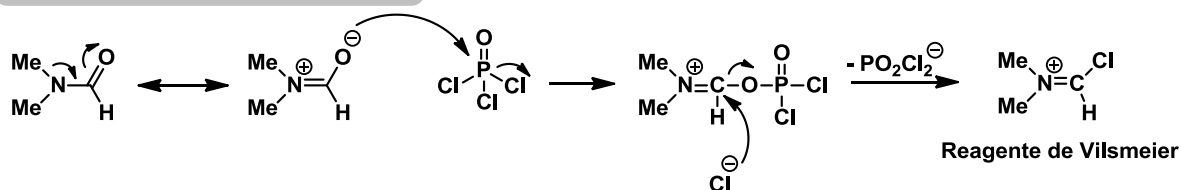
A funcionalização de *meso*-tetra-arilporfirinas via grupo formilo tem assumido um particular destaque e relevância atendendo à versatilidade deste grupo funcional para posteriores funcionalizações. A introdução deste grupo tem envolvido principalmente condições de formilação de Vilsmeier-Haack (**Esquema 4**).



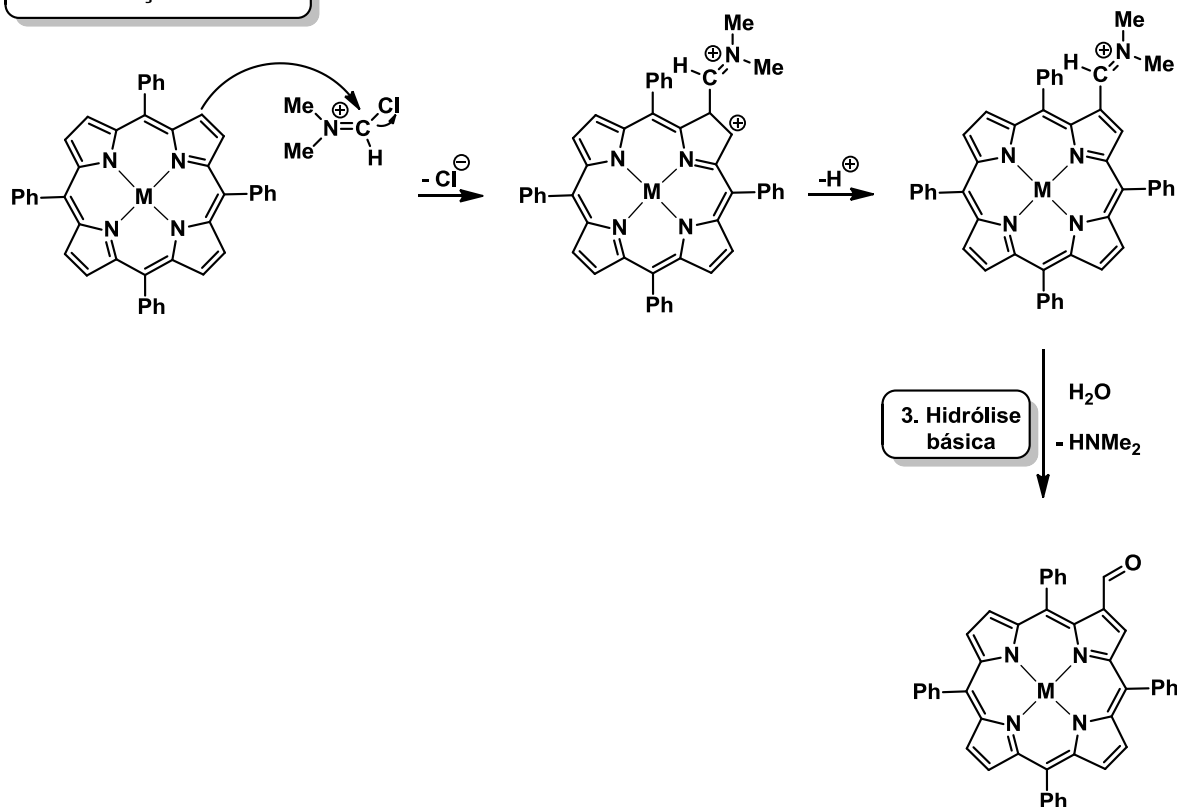
Esquema 4.

A reação de formilação de Vilsmeier-Haack foi publicada pela primeira vez em 1927.¹⁸ Nesta reação há a formação do reagente de Vilsmeier, que resulta da reação entre o cloreto de fosforilo (POCl_3) e a *N,N*-dimetilformamida (DMF), e subsequente ataque eletrofílico desta espécie ao substrato aromático que leva à formação do sal de imínio, que por hidrólise básica gera o grupo formilo (**Esquema 5**).¹⁹ A primeira abordagem deste tipo de reação em derivados porfirínicos foi feita por Inhoffen e colaboradores,²⁰ sendo atualmente considerado o método ideal para a introdução o grupo formilo na periferia do macrociclo.

1. Formação do reagente de Vilsmeier:



2. Substituição eletrofílica



Esquema 5.

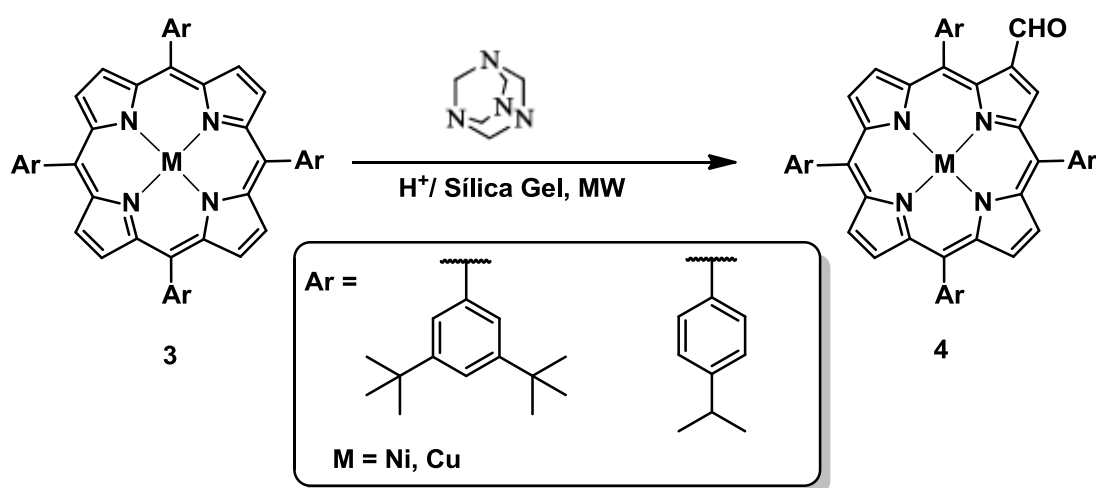
Uma vez que a formilação de Vilsmeier-Haack ocorre *via* substituição eletrofílica em condições ácidas, os macrociclos porfirínicos utilizados necessitam de estar complexados. A complexação do macrociclo evita a protonação dos nitrogénios pirrólicos e simultaneamente ativa a periferia do anel, tornando-o deste modo mais rico em eletrões e subsequentemente mais nucleofílico.

Muitos têm sido os estudos desenvolvidos e reportados na literatura envolvendo a reação de formilação de Vilsmeier-Haack com diferentes complexos porfirínicos. Através



destes estudos é possível concluir que os complexos de Pt são muito pouco reativos, enquanto os complexos porfirínicos de Zn(II) e Mg(II) não toleram as condições ácidas da reação, conduzindo à saída do metal do interior do macrociclo e subsequente formação do derivado porfirínico na forma de base livre.²¹ No que diz respeito aos complexos de Cu(II) e Ni(II), estes permitem obter os melhores rendimentos, 90% e 74% respetivamente, e são os iões metálicos que melhor toleram as condições agressivas da reação. No entanto, a utilização de metaloporfirinas de Cu(II) face aos derivados de Ni(II) apresenta algumas vantagens e entre elas destacam-se: 1) a facilidade em remover o ião metálico em meio ácido antes do passo de hidrólise e subsequente possibilidade de caracterização do macrociclo por RMN de ^1H e ^{13}C e 2) um rendimento superior ao verificado para os derivados de Ni(II).²²

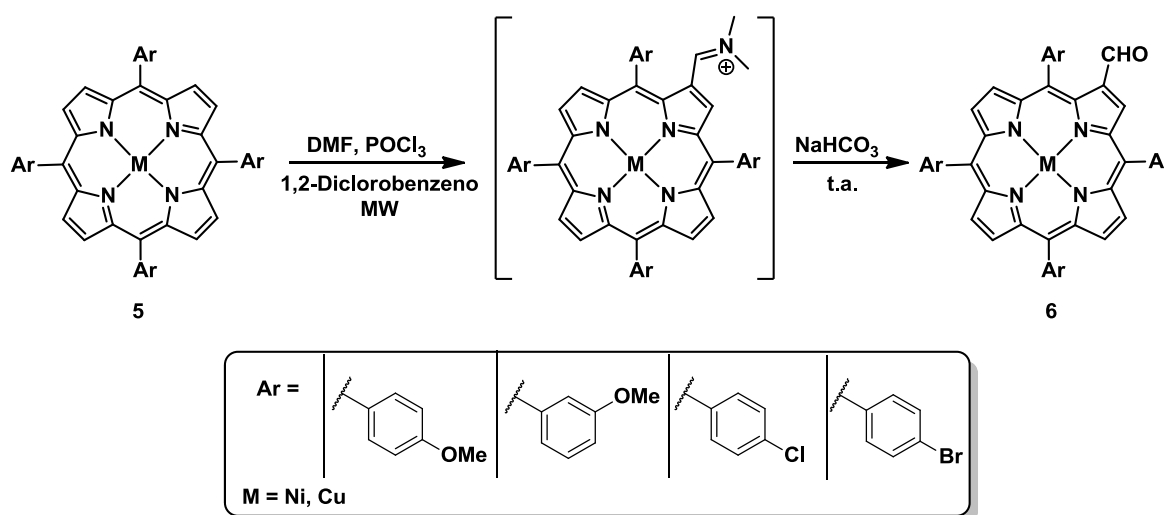
Mais recentemente, Yaseen e colaboradores²³ propuseram pela primeira vez a reação de formilação do macrociclo porfirínico sob as condições de Duff. Nestas condições, a formilação foi realizada na presença de urotropina usando suportes poliméricos inorgânicos ou sílica gel acidificada sob irradiação de micro-ondas, tendo-se obtido a partir dos derivados complexados de Ni(II) e Cu(II) **3** os respetivos derivados formilados **4**, com rendimentos entre 50% e 54%, respetivamente (**Esquema 6**).²³ É ainda importante realçar que os autores também demonstraram que quando esta reação é realizada usando suportes inorgânicos ou sílica gel nas condições de Vilsmeier, apenas ocorre a descomplexação do macrociclo porfirínico.²³



Condições da reação: W = 200 Watts , Tempo = 18 minutos , Temperatura = 111°C

Esquema 6.

Recentemente, o grupo de Química Orgânica da Universidade de Aveiro descreveu pela primeira vez a reação de formilação das *meso*-tetrafenilporfirinas **1** nas condições Vilsmeier-Haack sob irradiação de micro-ondas.²⁴ Os autores também estenderam este estudo a outras *meso*-tetra-arilporfirinas **5** complexadas com Ni(II) e Cu(II) (**Esquema 7**).²⁴



Esquema 7.

Os estudos efetuados permitiram concluir que a preparação das 2-formil-*meso*-tetra-arilporfirinas **6**, através da reação de formilação de Vilsmeier-Haack usando radiação de micro-ondas, pode ser mais eficiente quando comparada com o aquecimento convencional.²⁴ O procedimento proposto pelos autores permitiu verificar que não há perda de eficiência quando as reações são realizadas em larga escala e que há uma redução considerável do tempo necessário para obter os derivados β -formilados (de horas para minutos, 15 e 30 minutos, para os derivados de cobre(II) e níquel(II), respetivamente), com aumento notável dos rendimentos de algumas porfirinas.²⁴ Este estudo descreve ainda a preparação de derivados bis-formilados a partir dos respetivos derivados mono-formilados com rendimentos de 60%.

Como já foi referido anteriormente, a introdução do grupo formilo no macrociclo porfirínico assume um papel fundamental na funcionalização. De facto, as 2-formil-*meso*-tetra-arilporfirinas têm sido bastante utilizadas no trabalho desenvolvido quer pelo grupo de Química Orgânica da Universidade de Aveiro,^{25,26,27,28,29} quer no desenvolvido por

outros grupos.^{30,31,32,33,34} Estas funcionalizações recorrem a um vasto número de reações, tais como as de Wittig,^{31,32} Horner-Emmons,^{48e} condensação aldólica,^{33,34} 1,5-eletrociclizações,²⁷ ciclo-adições 1,3-dipolares,^{34,35} base de Schiff,^{30f} entre outras (**Figura 11**).

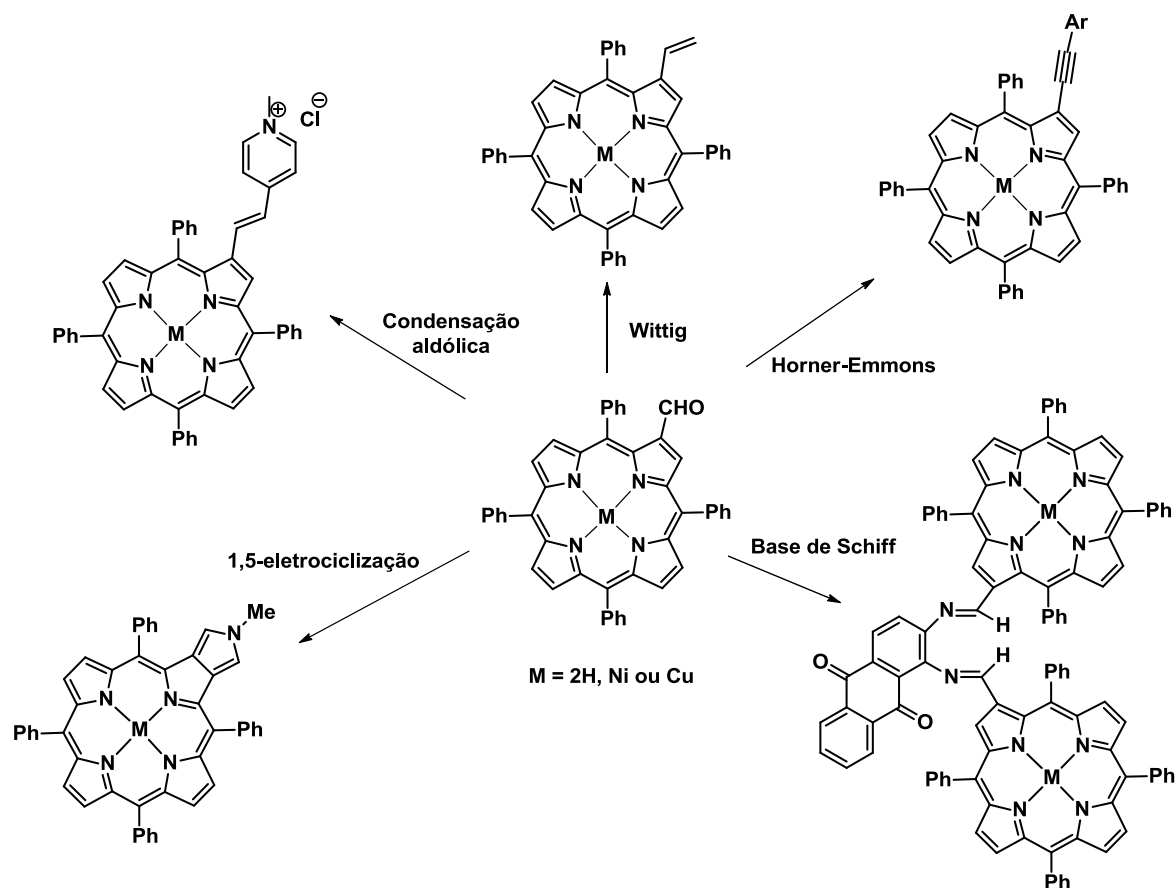
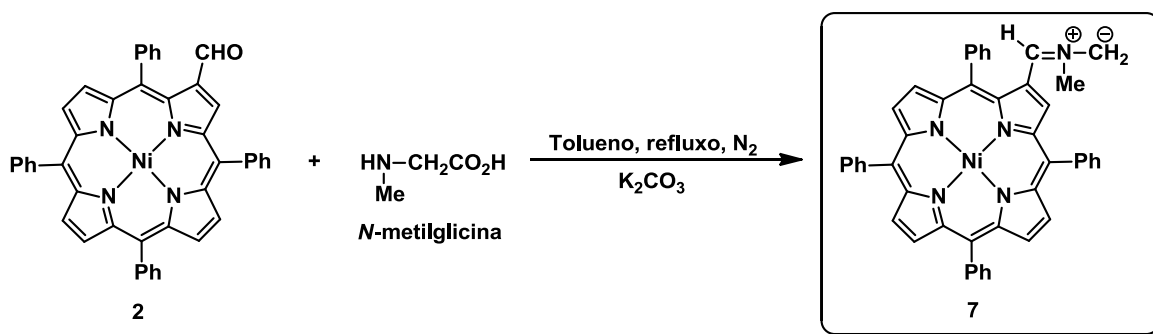


Figura 11. Alguns exemplos de reações de funcionalização a partir de 2-formil-TTP.

Considerando as reações de ciclo-adição 1,3 dipolares, Cavaleiro e colaboradores sintetizaram o ileto azometínico **7** a partir da reação do complexo de Ni(II) da 2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirina **2** com *N*-metilglicina, em tolueno a refluxo sob atmosfera de azoto e na presença de K_2CO_3 (**Esquema 8**).³⁴

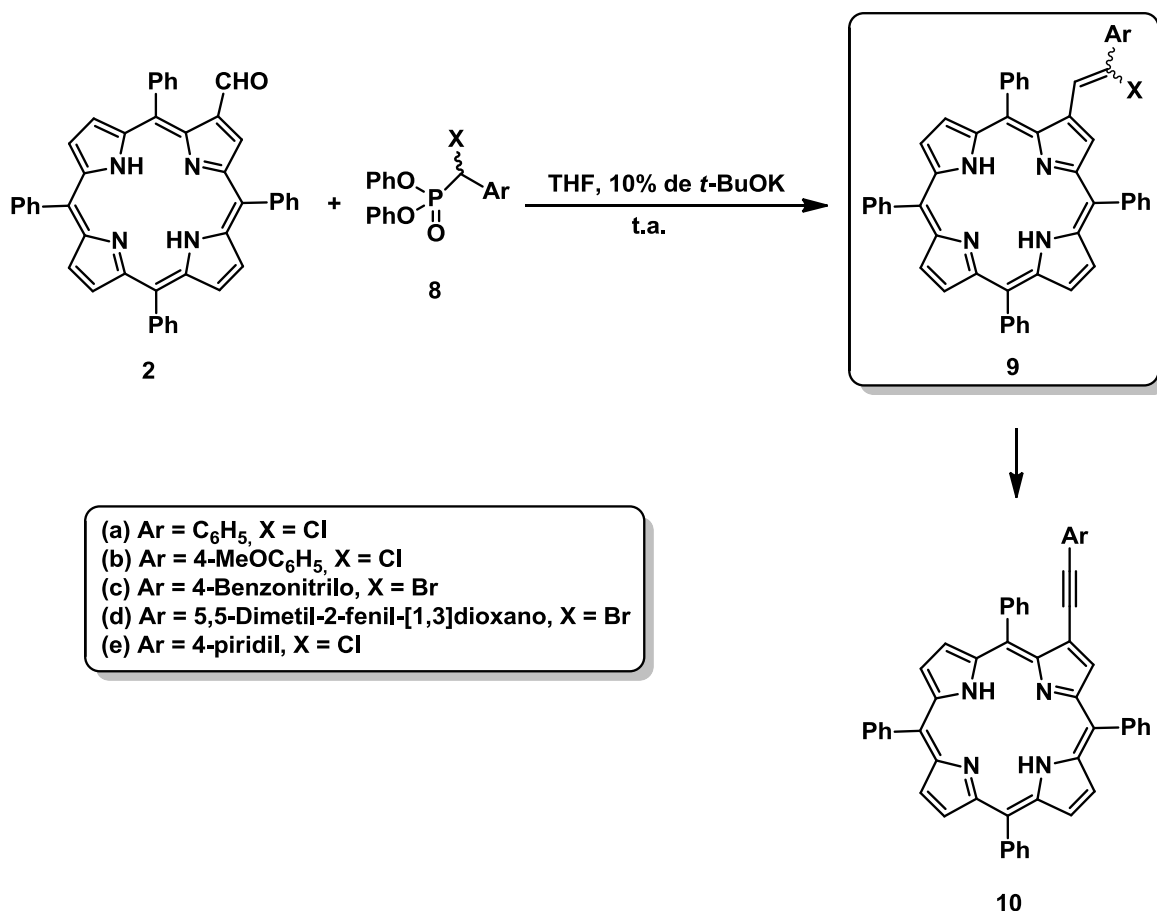


Esquema 8.

Seguidamente, os autores estudaram a reatividade do ileto sintetizado na presença de diferentes dipolarófilos (*N*-fenilmaleimida, fumarato de dimetilo, acetilenodicarboxilato de dimetilo, *trans*-β-nitroestireno, 1,4-benzoquinona e 1,4-naftoquinona)³⁴ e na ausência dos mesmos.²⁹ Estes estudos permitiram concluir que na presença de dipolarófilos ocorre uma reação 1,3-dipolar enquanto na ausência dos mesmos o ileto azometínico reage segundo uma reação de 1,5-eletrociclicização.

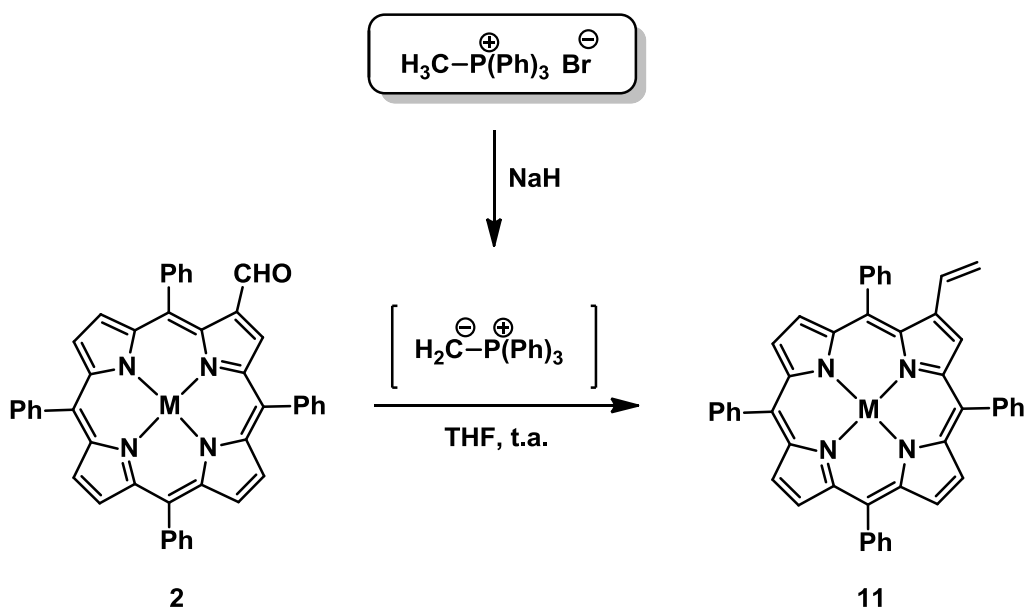
No que se refere às reações de Horner-Emmons, estas surgiram como uma excelente metodologia para preparar os compostos **10** com um grupo etinilo na posição β-pirrólica (**Esquema 9**),^{30e} uma vez que as outras alternativas recorriam à reação de Sonogashira³⁵ ou a outras reações de acoplamento catalisadas por metais a partir da respetiva 2-bromoporfirina.³⁶ Estas últimas reações apresentavam algumas desvantagens, destacando-se: (i) os baixos rendimentos, (ii) a impossibilidade de preparar os derivados em grande escala e (iii) a dificuldade em purificar os compostos obtidos.





Esquema 9.

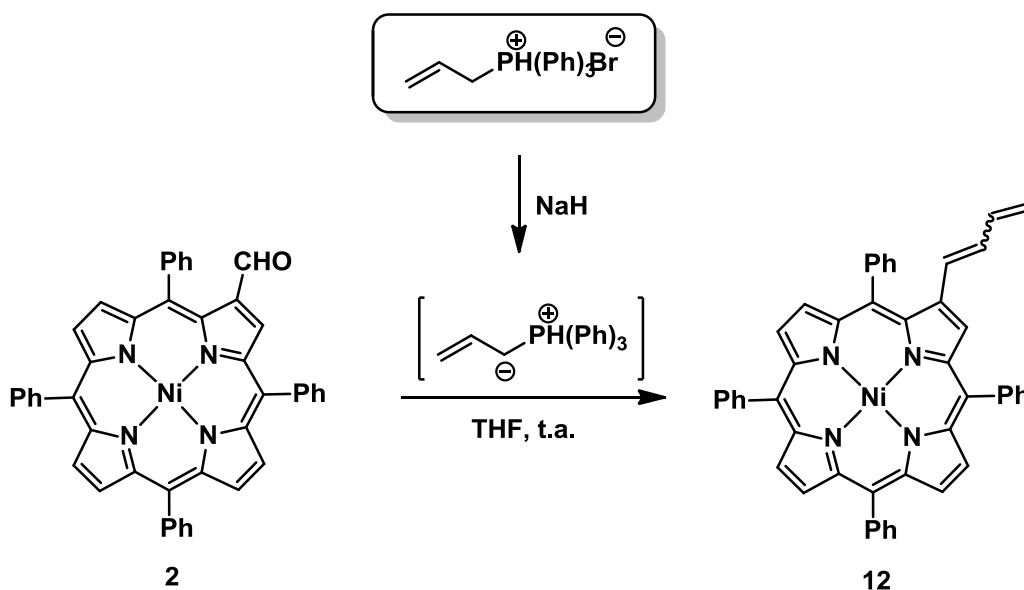
Relativamente às reações de Wittig, estas têm tido um papel crucial na funcionalização de *meso*-tetra-arylporfirinas.^{31,32} Este tipo de reações permite a introdução do grupo vinilo na posição β -pirrólica do macrociclo porfirínico e envolve dois passos distintos: no primeiro o ileto é gerado *in situ* por tratamento do brometo de metiltrifenilfosfónio com NaH, e no segundo ocorre a reação deste com os respetivos derivados formilados (**Esquema 10**).



Esquema 10.

As 2-vinil-*meso*-tetra-arilporfirinas formadas pela reação de Wittig têm sido amplamente estudadas, nomeadamente, em reações de Diels-Alder em que participam como dienos.^{25,37,38} É ainda importante salientar que estes derivados também têm um elevado potencial para ser utilizados em reações de ciclo-adição 1,3-dipolar como dipolarófilos, uma vez que a dupla ligação, onde a reação ocorre, não entra na deslocalização de eletrões π do anel.³⁹

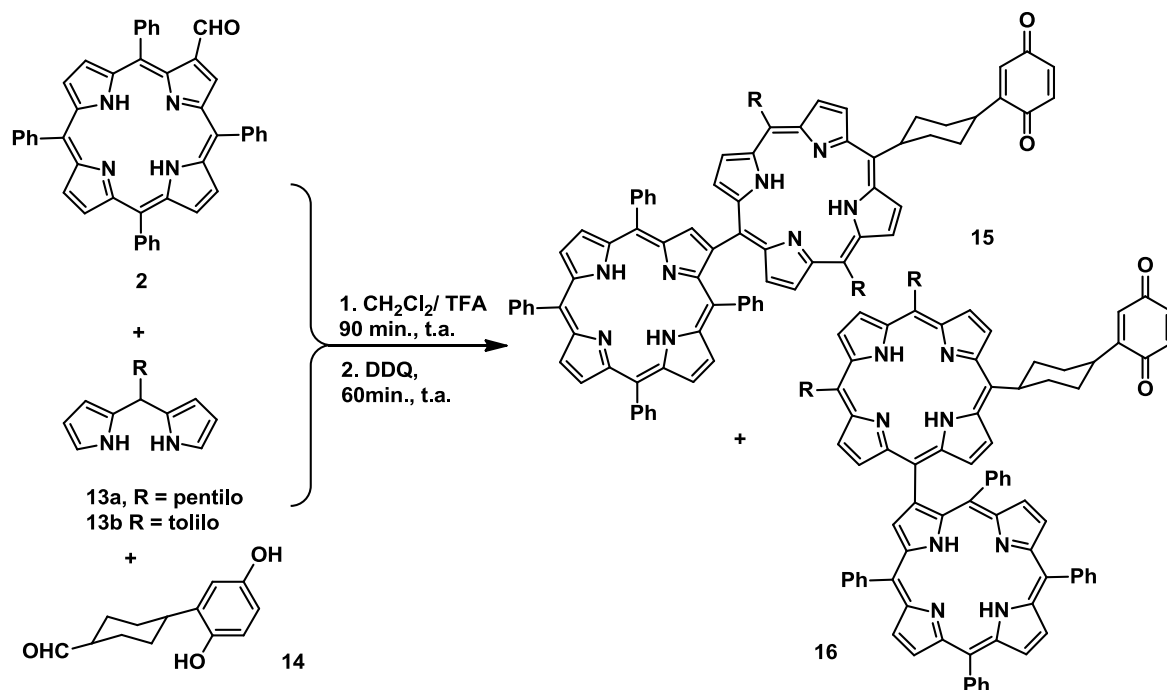
Mais tarde, Cavaleiro e colaboradores⁴⁰ utilizaram a 2-formil-TPP **2** como precursor na síntese da butadienilporfirina **12**, através da reação de Wittig, com um rendimento de 74%. A única diferença entre esta reação e a anteriormente descrita é a utilização de um ileto alílico que é gerado *in situ* por tratamento do brometo de alilfosfónio com NaH em tolueno (**Esquema 11**). Subsequentemente, a reatividade do derivado porfirínico **12** em reações de Diels-Alder na presença de diversos dienófilos ou em reações de eletrociclicização térmica na ausência dos mesmos foi estudada. É ainda de referir que os autores estenderam este estudo a reações de eletrociclicização com porfirinas contendo dois grupos butadienilo em unidades pirrólicas adjacentes ou opostas.⁴⁰



Esquema 11.

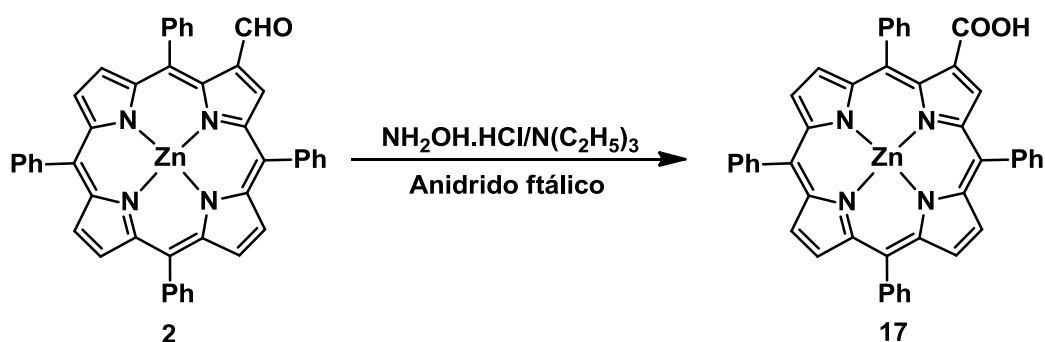
A funcionalização de 2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinas tem envolvido outro tipo de reações, muitas delas com o objetivo de preparar novos derivados porfirínicos para posterior aplicação em diversas áreas.

Em 2004, Senge e colaboradores^{30d} publicaram uma nova rota sintética para a síntese de dímeros do tipo porfirina-porfirina e de tríades porfirina-porfirina-quinona (P-P-Q) covalentemente ligados, uma vez que estes últimos são considerados compostos modelo bastante versáteis para mimetizar os processos de transferência de elétrons naturais. Inicialmente começaram por estudar a condensação catalisada por ácido de 2 equivalentes de **2** com dois equivalentes de dipirrometanos *meso* substituídos **13a** e **13b**, e subsequente oxidação com DDQ. Posteriormente, os autores voltaram a usar os blocos de construção **2** e **13** mas na presença do aldeído **14**. Estas condições permitiram a síntese das tríades porfirina-porfirina-quinona **15** e **16** (P-P-Q) (Esquema 12).^{30d}



Esquema 12.

Mais recentemente Reeta e colaboradores^{30c} propuseram um método para preparar *meso*-tetra-arilporfirinas substituídas com um grupo carboxílico diretamente ligado à posição β -pirrólica. Nesta abordagem sintética os autores utilizaram o complexo de zinco da 2-formil-TTPP **2** que foi eficientemente convertido no respetivo ácido **17**, utilizando cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$), trietilamina e anidrido ftálico (Esquema 13).^{30c}

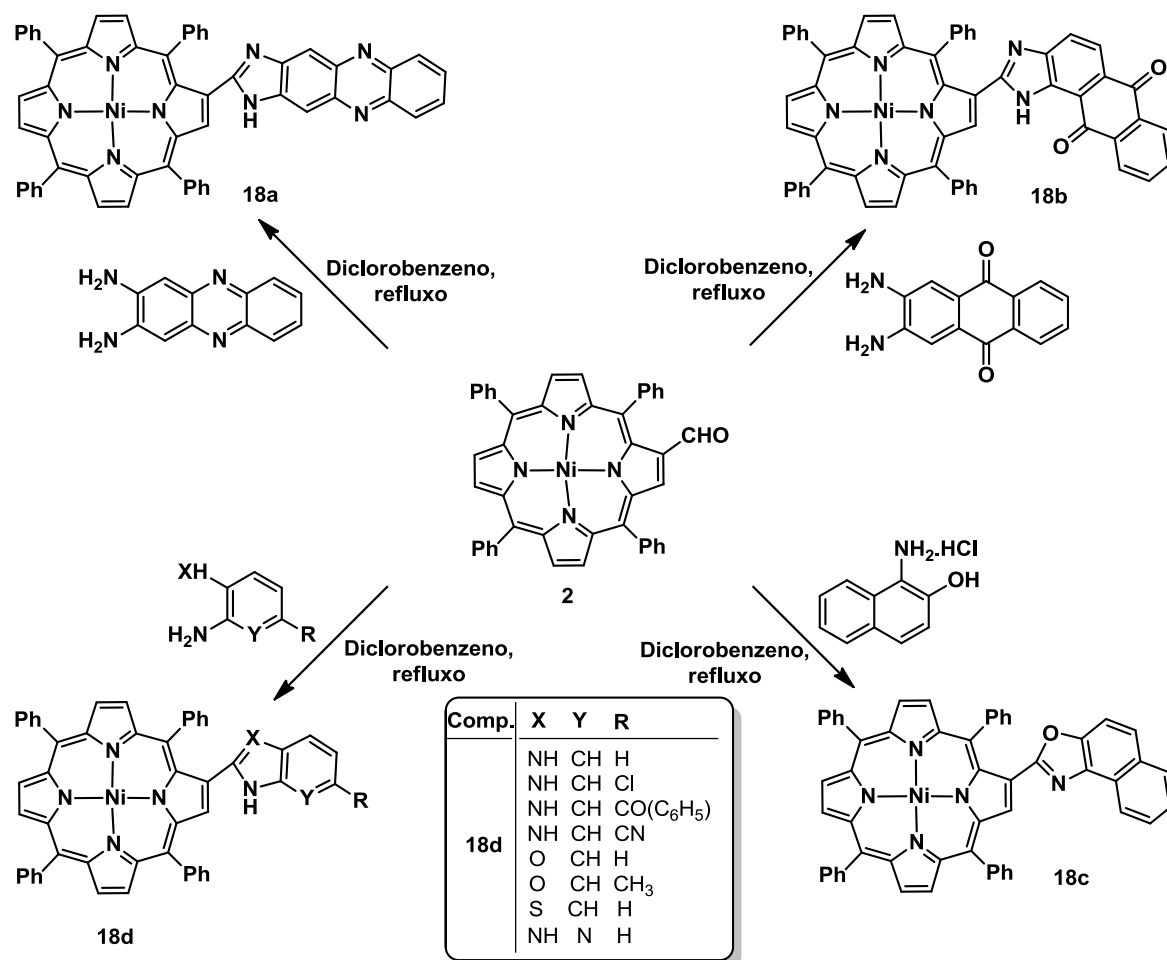


Esquema 13.

Uma abordagem diferente sobre a funcionalização de 2-formil-TTPP foi considerada por Sharma e colaboradores.⁴¹ Os autores descreveram a reação de condensação do

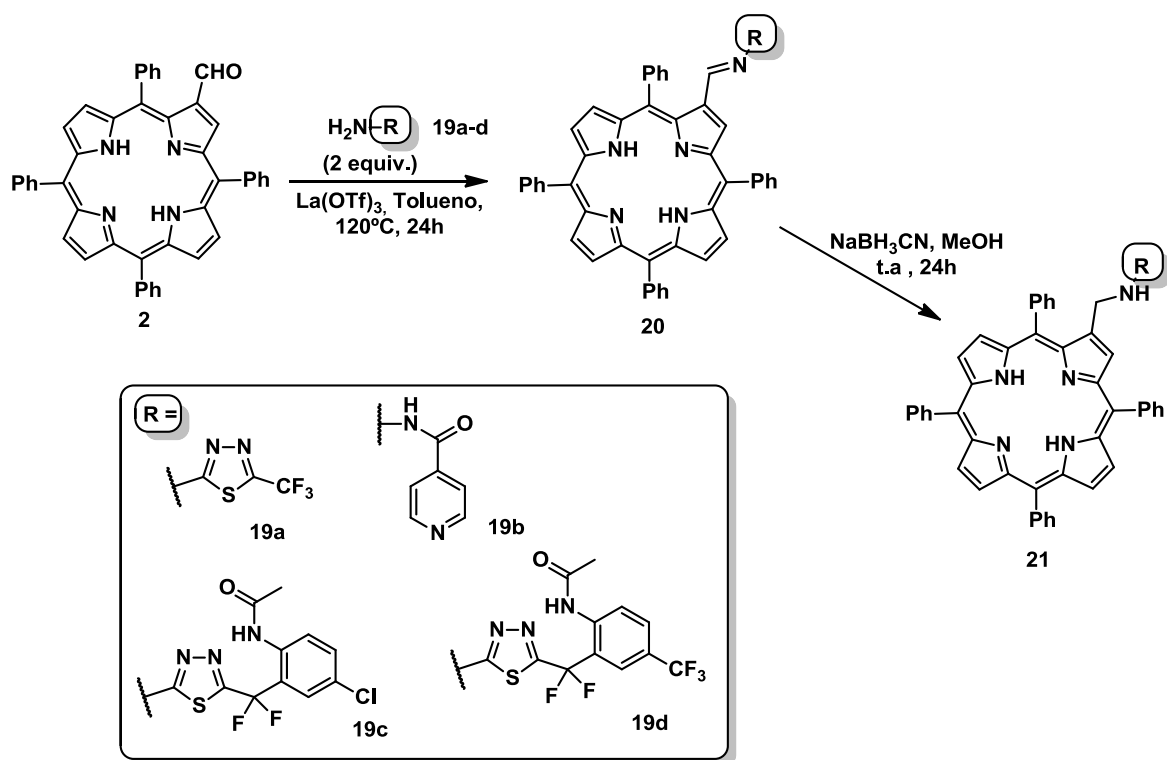


complexo de Ni(II) da 2-formil-TPP **2** com *o*-arilenodiaminas, *o*-aminofenóis, *o*-aminotiofenóis ou 1-amino-2-naftanol. As condensações foram realizadas em 1,2-diclorobenzeno a refluxo, tendo sido obtido os correspondentes derivados porfirínicos **18** com rendimentos entre 75% e 95% (**Esquema 14**).⁴¹



Esquema 14.

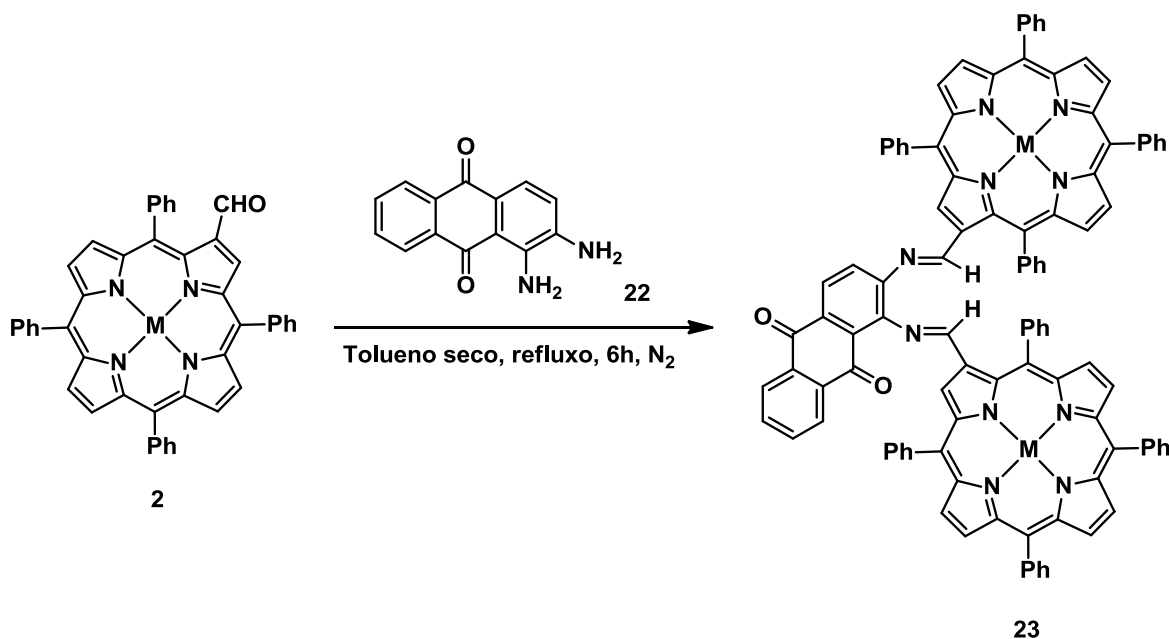
Recentemente, Cavaleiro e colaboradores⁴² descreveram a síntese de derivados porfirínicos **21** através de uma reação de aminação redutiva. A reação proposta pelos autores ocorre via condensação da 2-formil-TPP **2** com as adequadas aminas heterocíclicas **19**, seguida da redução da função imina. A reação de condensação das aminas foi realizada em tolueno a refluxo e na presença de La(OTf)₃ e a subsequente redução da função imina foi efetuada à temperatura ambiente com cianoborohidreto de sódio, NaBH₃CN (**Esquema 15**).⁴²



Esquema 15.

Os estudos de determinação de oxigénio singlete demonstraram a elevada eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ dos compostos sintetizados **21**, surgindo a hipótese da sua utilização como fotossensibilizadores no tratamento de Leismaniose cutânea.

Recentemente, Giribabu e colaboradores^{30f} propuseram a síntese de tríades do tipo bisporfirinas-antraquinonas **23** que foram utilizados como modelos para estudos de transferência eletrónica. A preparação destes derivados porfirínicos ocorre através de uma reação de condensação de base de Schiff. Esta reação foi realizada em tolueno seco a refluxo e sob atmosfera de azoto na presença de 1,2-diamino-antraquinona **22**, tendo sido obtido a tríade **23** com 60% de rendimento (Esquema 16).^{30f}



Esquema 16.

1.6. Aplicações das porfirinas

As propriedades físico-químicas das porfirinas e dos seus derivados conferem-lhe um papel de destaque em áreas tão distintas como, na medicina,⁴³ catálise,⁴⁴ modelos biomiméticos,⁴⁵ quimossensores,⁴⁶ células fotovoltaicas,⁴⁷ entre outras.

Relativamente à aplicação na medicina, é de destacar a utilização de um elevado número de compostos porfirínicos, como fotossensibilizadores (PS), em terapia fotodinâmica (PDT – **Photodynamic Therapy**) no tratamento do cancro e de outras doenças,⁴³ assim como na fotoinativação de microrganismos (PDI – **PhotoDynamic Inactivation**).⁴⁸

1.6.1. Terapia Fotodinâmica (PDT)

A terapia fotodinâmica representa uma técnica bastante promissora para o diagnóstico e tratamento de diversos cancros. Resumidamente, o princípio básico desta técnica consiste na combinação de luz visível, de oxigénio molecular e de um fotossensibilizador para induzir fotoquimicamente a destruição de tecidos biológicos,

principalmente tecidos neoplásicos. Em linhas gerais, o processo terapêutico é iniciado pela administração tópica ou sistêmica de um fotossensibilizador e pela sua acumulação preferencial nas células alvo. Posto isto, o tecido alvo é irradiado com um feixe de luz de comprimento de onda adequado, que na presença de oxigénio induz a produção de espécies citotóxicas que vão provocar dano no tecido irradiado.⁴⁹

O processo de fotossensibilização é demonstrado na **Figura 12**. Este processo pode ser explicado pela capacidade do macrociclo porfirínico absorver energia na zona do visível, passando deste modo do seu estado fundamental de singuleto (S_0) para um estado excitado de maior energia (S_n). Este estado excitado pode então decair por cruzamento intersistemas (ISC) para um estado de menor energia (o estado excitado tripleto) e subsequentemente pode interagir segundo duas vias diferentes, denominadas por mecanismo do tipo I e mecanismo do tipo II.⁵⁰ O mecanismo do tipo I envolve reações de transferência de eletrões do PS no estado excitado tripleto para um substrato produzindo radicais livres, enquanto o mecanismo do tipo II envolve a transferência de energia do PS do estado excitado tripleto para o oxigénio molecular no estado fundamental tripleto (3O_2), convertendo-o em oxigénio singlete (1O_2). Apesar do oxigénio singlete ter um tempo de vida muito reduzido, o que limita a sua atividade no local em que é gerado, a maioria dos resultados sugere que é a espécie citotóxica preferencial.^{51,52,53}

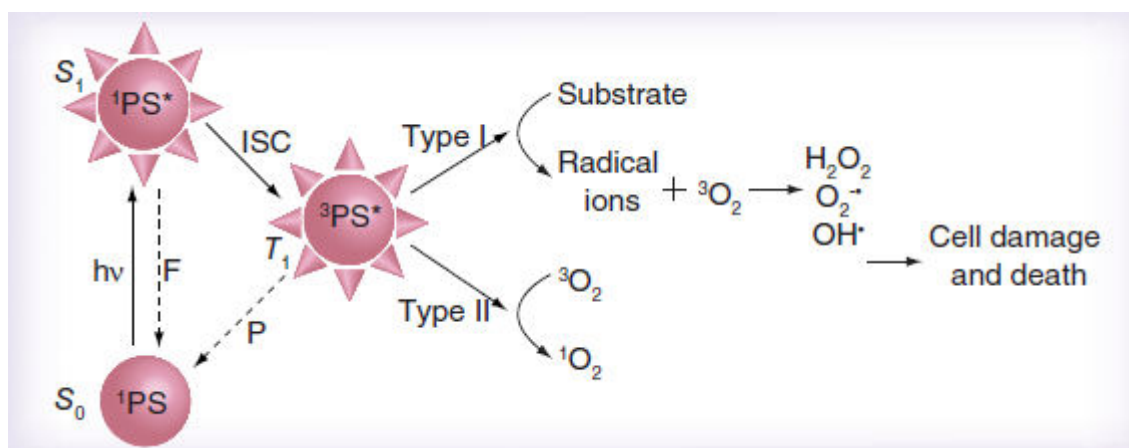


Figura 12. Processo de fotossensibilização que ocorre durante a inativação fotodinâmica. ($^3PS^*$ (T_1)) – Estado excitado tripleto; F – emissão de fluorescência; $h\nu$ – luz; ISC – Cruzamento intersistemas; P – Emissão de fosforescência; S_0 – Estado fundamental; S_1 – Estado excitado singuleto)⁵¹

Um elevado número de derivados porfirínicos têm sido sintetizados e estudados para aplicação como fotossensibilizadores. Um particular destaque é feito ao Photofrin[®], que surgiu como primeiro agente porfirínico a ser aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) e a ser comercializado para o uso em PDT no tratamento de certos tipos de cancro (Figura 13).⁵³

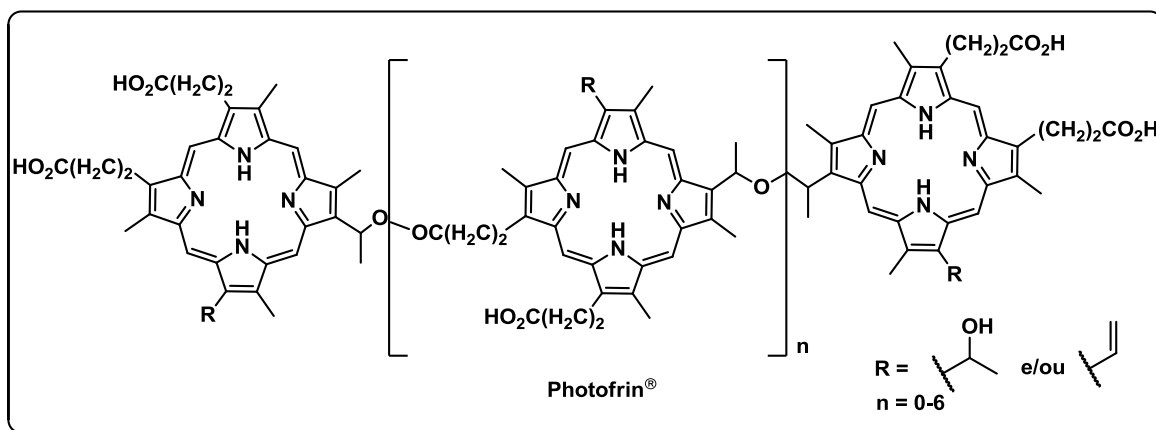


Figura 13. Representação das ligações possíveis entre os monómeros que constituem o Photofrin[®], aprovado para aplicação em terapia fotodinâmica.

O Photofrin[®], denominado por PS de 1^a geração, apesar de ser bastante utilizado no tratamento de vários tumores e da sua utilização apresentar bons resultados, também apresenta algumas desvantagens. Entre elas é possível destacar-se: i) os elevados riscos de fotossensibilidade cutânea mediante exposição à luz durante algumas semanas, ii) a baixa seletividade para com o tecido tumoral, iii) a banda de absorção onde ocorre a fotoativação é pouco intensa e não se encontra na zona ideal do espectro e, iv) tratar-se de uma mistura complexa.⁵³

Com o objetivo de eliminar estas desvantagens, surgiram os PSs de 2^a geração. A síntese destes PSs permitiu melhorar algumas características importantes para a utilização deste tipo de compostos em PDT, tais como: i) solubilidade adequada em líquidos corporais e de rápida eliminação, ii) elevada seletividade para o tecido neoplásico, iii) inexistência de toxicidade na ausência de luz e ausência de degradação pela mesma, iv) absorção na região dos 650-800 nm, permitindo uma maior penetração nos tecidos, v) elevado rendimento quântico de estado tripleto, vi) síntese fácil e vii) substância pura.⁵³

Os PSs de 2ª geração podem ser agrupados em três grupos de famílias distintos: 1) clorinas e bacterioclorinas; 2) benzoporfirinas; e 3) ftalocianinas e naftalocianinas. Os derivados reduzidos, clorinas e bacterioclorinas, apresentam uma banda de absorção intensa entre os 660-690 nm e os 730 nm, respetivamente, enquanto as benzoporfirinas, apresentam uma banda de absorção na zona dos 690 nm e uma elevada capacidade para se localizarem rapidamente nas células neoplásicas (**Figura 14**). No que diz respeito às ftalocianinas e naftalocianinas, estas apresentam uma banda de absorção intensa entre os 670 nm e 820 nm, respetivamente.^{53,54}

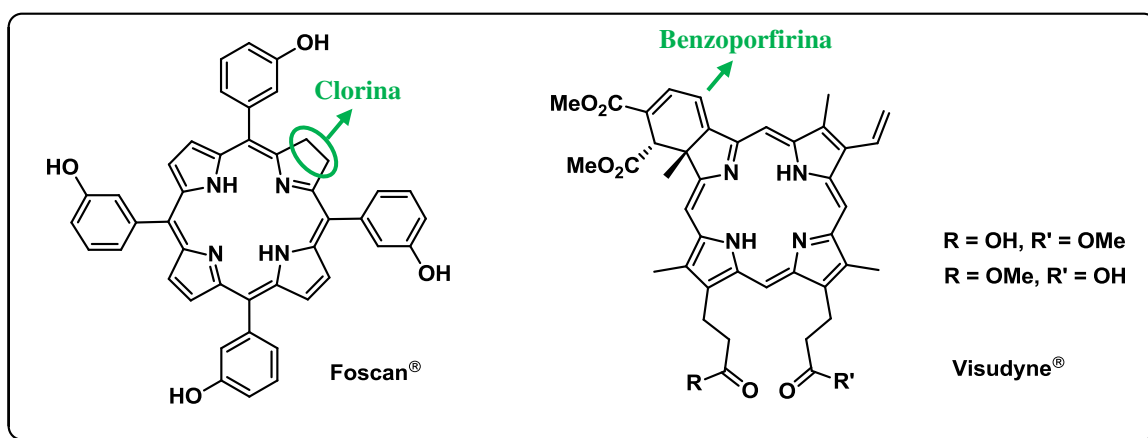


Figura 14. Estruturas moleculares do Foscan® e do Visudyne®, exemplos de fotossensibilizadores de 2ª geração.

1.6.2. Fotoinativação de microrganismos (PDI)

Nos últimos anos, a destruição de microrganismos patogénicos tem surgido como um desafio permanente, devido ao desenvolvimento de resistência pelos microrganismos e, por isso, diversas linhas de investigação procuram novos métodos alternativos para a sua inativação, tais como a fotoinativação de microrganismos (PDI).^{55,56,57} Esta abordagem fotodinâmica é considerada uma alternativa útil aos medicamentos sistémicos no tratamento de infeções localizadas, evitando-se, deste modo, o aparecimento e a incidência de estirpes resistentes aos antibióticos utilizados atualmente.

Na inativação fotodinâmica de microrganismos, tais como, bactérias, vírus, fungos e parasitas, é necessário a utilização de um fotossensibilizador que após ativação pela luz

visível é capaz de gerar espécies reativas de oxigénio, como o oxigénio singlete, necessário para o processo de inativação.^{50,58,59}

Atualmente, várias substâncias fotossensíveis têm demonstrado elevada eficiência na inativação de bactérias Gram positivas [Gram-(+)], enquanto a inativação por este processo nas bactérias Gram negativas [(Gram-(-)] apresenta uma maior resistência, provavelmente devido à menor eficiência de adsorção por parte do fotossensibilizador.^{57,60,61} Estas diferenças estão relacionadas com o facto da estrutura e composição das células bacterianas apresentarem algumas variações de espécie para espécie, podendo conduzir a diferentes formas de ligação e acumulação dos fotossensibilizadores, bem como influenciar os tempos de adsorção necessários para a acumulação do composto antes da irradiação.⁶¹

Segundo o reportado na literatura, geralmente, os PSs neutros ou aniónicos ligam-se com elevada eficiência às bactérias Gram-(+) conduzindo à fotoinativação destes microrganismos.^{62,63} A sensibilidade das Gram-(+) em relação a esta técnica é explicada pela sua fisiologia, uma vez que a membrana deste tipo de bactérias é constituída por uma camada porosa de peptidoglicano (30-100 nm), intimamente associada com ácidos lipotéicos e ácidos teicóicos carregados negativamente, que confere um elevado grau de porosidade à bactéria (**Figura 15**).⁵¹ Este arranjo permite que macromoléculas com pesos moleculares de 30 000-60 000, tais como glicopeptídeos e polissacarídeos, consigam difundir-se facilmente na membrana citoplasmática e portanto esta membrana não atua como uma barreira de permeabilidade para a maioria dos fotossensibilizadores utilizados, uma vez que possuem pesos moleculares não superiores a 1500-1800 Da.⁵¹

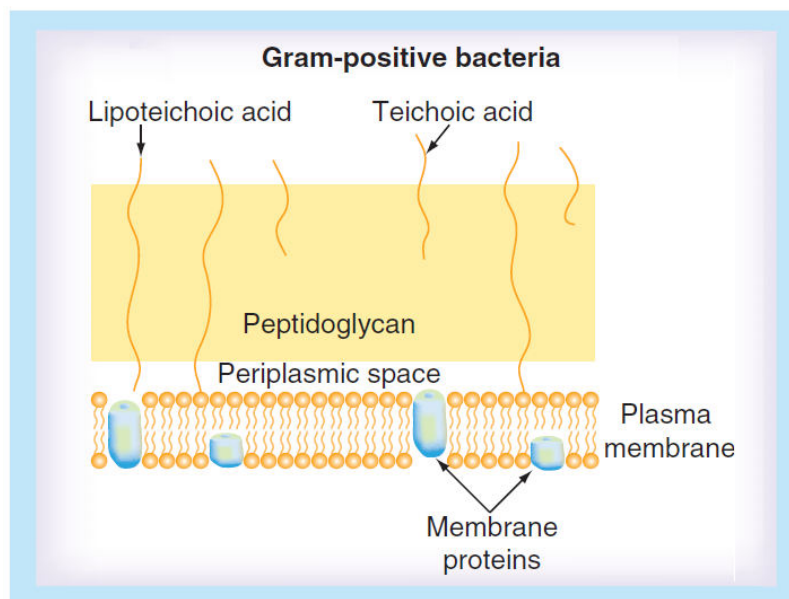


Figura 15. Estrutura da parede bacteriana das Gram positivas.⁵¹

Por outro lado, os mesmos PSs ligam-se apenas à membrana externa das bactérias Gram(-), não ocorrendo o processo de fotoinativação. Isto é explicado pelo facto das bactérias Gram(-) possuírem uma camada externa de lipopolissacarídeos (LPS), localizada externamente à camada de peptidoglicano. Esta membrana externa é composta por lipopolissacarídeos carregados negativamente, fosfolípidos, lipoproteínas e proteínas transmembranares – porinas (**Figura 16**).⁵¹ Estas proteínas transmembranares permitem a passagem de pequenas moléculas do exterior para o espaço periplasmático, entre a camada de peptidoglicano e a de LPS. Os radicais livres e o oxigénio singlete gerados fora das células podem ficar retidos neste espaço e por isso não chegam à membrana citoplasmática em concentração suficiente, o que pode explicar a maior resistência deste tipo de bactérias à PDI.⁶¹

Uma vez que a parede bacteriana é a principal diferença entre estes dois tipos de bactérias, quando o PS atravessa esta barreira o mecanismo de inativação será semelhante e envolve a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) pela irradiação da luz que iniciam a degradação da parede celular. Estas ROS podem interatuar com proteínas, lípidos, resíduos de aminoácidos e bases de ácidos nucleicos, como a guanina e a timidina

(molécula que é formada quando uma timina é ligada a um anel de desoxirribose) e conduzir à citotoxicidade.⁶²

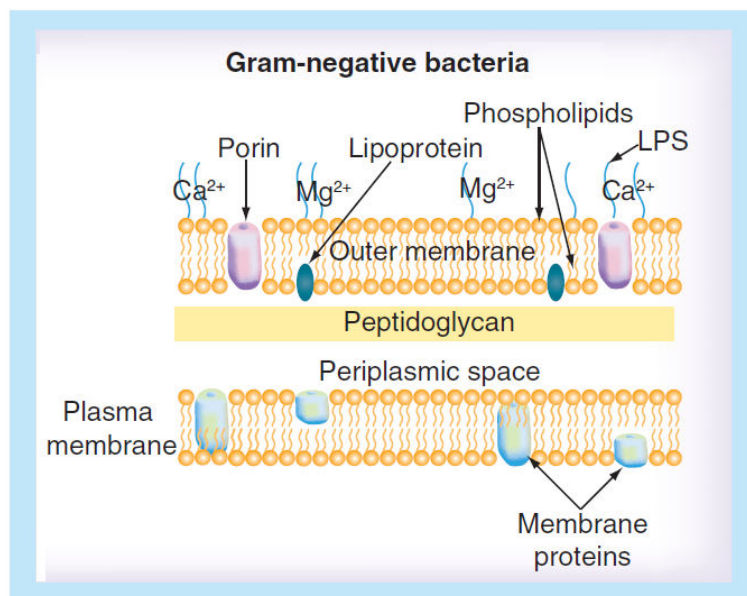


Figura 16. Estrutura da parede bacteriana das Gram negativas.⁵¹

Os derivados porfirínicos têm tido um grande destaque na inativação de microrganismos e a sua maior ou menor eficiência nesta técnica está relacionada com a sua estrutura química. Estudos recentes demonstraram que as porfirinas catiónicas *meso*-substituídas são mais eficientes do que as porfirinas neutras ou aniónicas na inativação de bactérias Gram(-), não sendo necessário a utilização de agentes de permeabilização de membranas, tais como, polimixina e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).^{64,65,66} A carga positiva do PS promove a interação eletrostática entre a porfirina e as cargas negativas da membrana externa das bactérias Gram(-), aumentando a eficiência do processo de fotoinativação.⁵¹

CAPÍTULO 2

– Estudos de síntese de novos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo –

2. Estudos de síntese de novos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo

2.1. Preâmbulo

Este capítulo está dividido em dois pontos principais. No primeiro é feito um breve resumo acerca do trabalho desenvolvido e reportado na literatura sobre funcionalização de 2-formil-5,10,15,20-tetra-arilporfirinas via condensação aldólica. Relativamente ao segundo ponto e tendo como objetivo a preparação de novos derivados porfirínicos catiónicos com propriedades adequadas para uma potencial aplicação em fotoinativação de microrganismos, é descrita a síntese de novos derivados do tipo porfirina-piridina envolvendo reações de condensação aldólica com diferentes acetilpiridinas e posterior cationização dos mesmos (**Figura 17**).

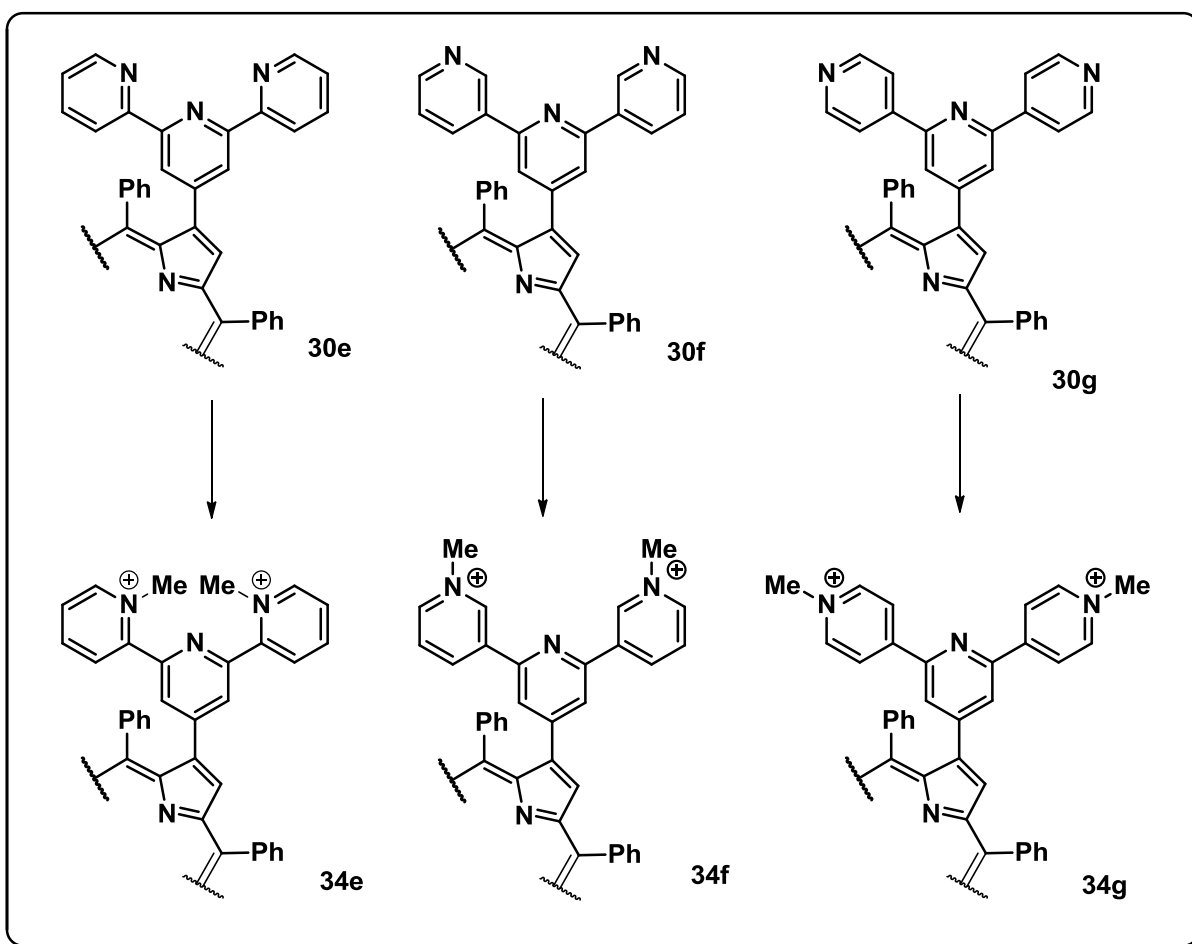
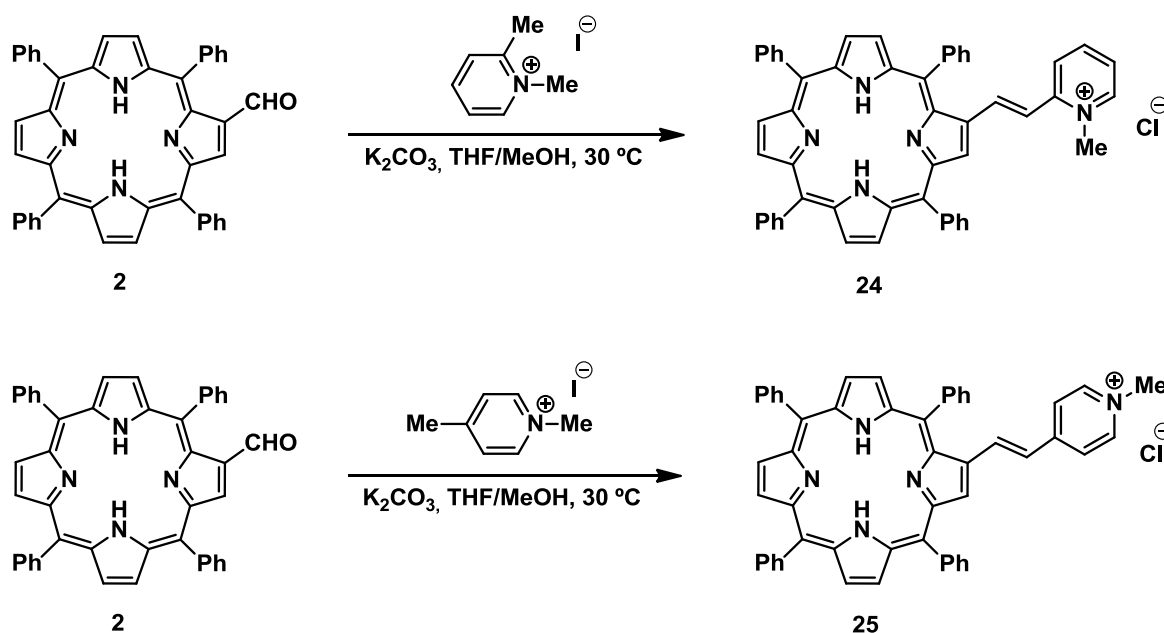


Figura 17. Estrutura dos novos derivados catiónicos β -funcionalizados com o grupo piridilo preparados no âmbito desta dissertação.

2.2. Reações de condensação do tipo aldol na funcionalização de 2-formil-5,10,15,20-tetra-arilporfirinas

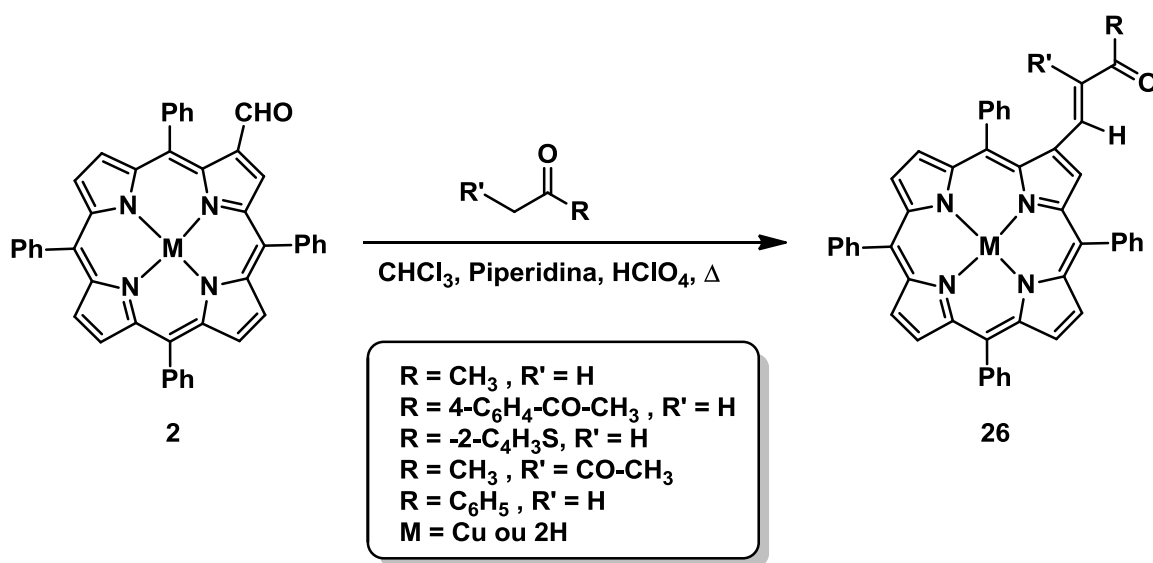
A possibilidade das 2-formil-tetra-arilporfirinas reagirem em reações de condensação de tipo aldol foi explorada por Cavaleiro e colaboradores.⁶⁷ Estes autores propuseram a síntese dos derivados catiónicos monossustituídos **24** e **25**, envolvendo a reação de condensação da 2-formil-TPP **2** com iodeto de 1,2- ou 1,4-dimetilpiridínio, respetivamente, na presença de K_2CO_3 (Esquema 17). Deste modo, ao fim de 1 hora a 30 °C, foi possível obter os derivados **24** e **25** com rendimentos de 60% e 65%, respetivamente.⁶⁷ Estes compostos apresentaram um perfil de fototoxicidade muito semelhante, no entanto, durante os estudos de fotoinativação com o *Herpes simplex tipo I* (HSV-1), verificou-se uma diferença notável entre ambos, apesar da sua semelhança estrutural. A uma concentração de 0,5 μM e após 5 minutos de irradiação com luz visível, o composto **24** foi capaz de fotoinativar 97% da população viral, enquanto o composto **25**, nas mesmas condições, não exibiu qualquer efeito tóxico.⁶⁷



Esquema 17.

Já Ishkov e colaboradores^{30a} propuseram nova metodologia sintética para a síntese de derivados do tipo porfirina-calcona **26**, através de uma reação do tipo de Claisen-Schmidt. Esta proposta metodológica envolve a formação *in situ* do sal imínio entre o

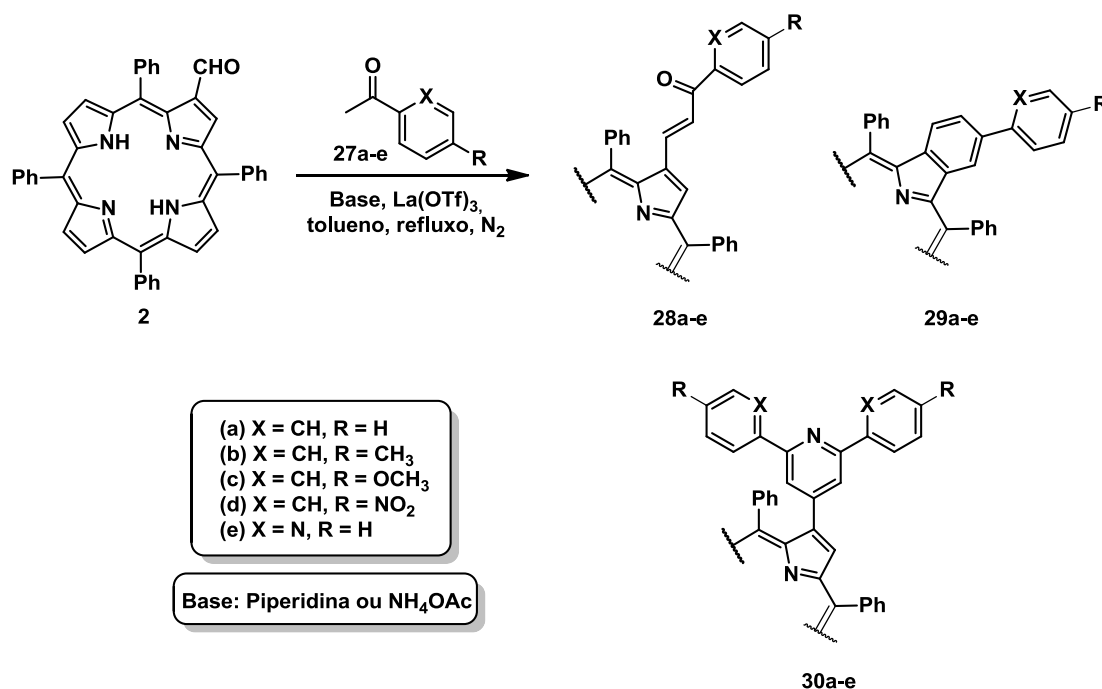
derivado 2-formil-TPP e a piperidina, na presença de ácido perclórico e em refluxo de clorofórmio (**Esquema 18**).^{30a} É importante salientar que a formação do sal de imínio apenas ocorre na presença de aminas secundárias e na presença de ácido perclórico, uma vez que quando a reação é realizada apenas na presença de piperidina não se observa a formação do produto desejado. Os autores também concluíram que se obtinham melhores rendimentos quando a reação era realizada na presença do derivado porfirínico de base livre do que quando é utilizado o respetivo complexo de Cu(II). Foi ainda referido que apenas os produtos da condensação com configuração *E* foram isolados.^{30a}



Esquema 18.

Mais recentemente, o grupo de Química Orgânica da Universidade de Aveiro revisitou a reação de condensação aldólica, entre a 2-formil-TPP **2** e uma série de cetonas aromáticas, mas utilizando diferentes condições experimentais.²⁶ Os autores, tendo em atenção ao descrito na literatura relativamente à ausência de reatividade da 2-formil-TPP e as acetofenonas através de uma reação do tipo de Claisen-Schmidt utilizando piperidina como base, decidiram testar a eficiência da reação na presença de piperidina e La(OTf)₃ em quantidades catalíticas. Nestas condições foi possível isolar o derivado do tipo porfirina-calcona **28**, com bons rendimentos. No entanto, quando esta reação foi realizada nas mesmas condições reacionais mas utilizando NH₄OAc como base verificou-se a formação de derivados do tipo benzoporfirina **29** e do tipo porfirina-piridina **30** (**Esquema**

19). Nestas novas condições reacionais é possível verificar que os derivados de tipo porfirina-calcona **28** podem ser em geral isolados como produto maioritário ou ser convertidos nos derivados do tipo benzoporfirina **29** e do tipo porfirina-piridina **30** de uma forma simples e versátil.²⁶



Esquema 19.

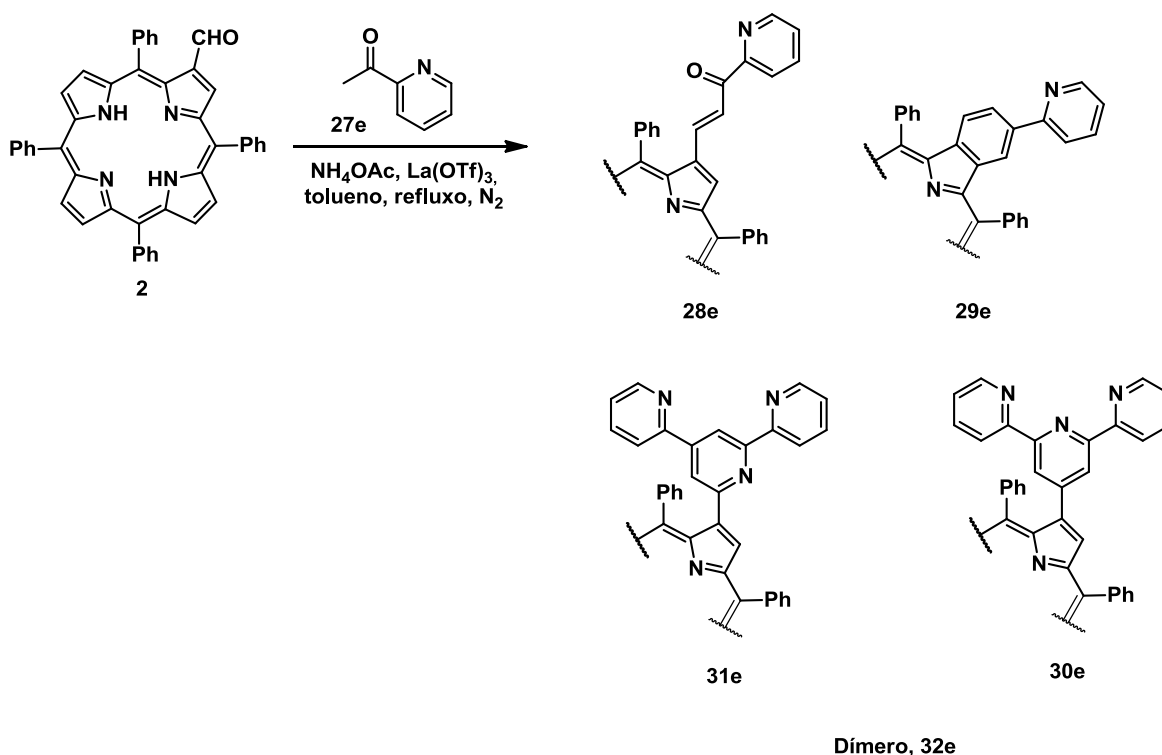
2.3. Síntese de novos derivados catiónicos β-funcionalizados com grupos piridilo

2.3.1. Reação de condensação do tipo aldol entre 2-formil-TPP e diferentes acetilpiridinas

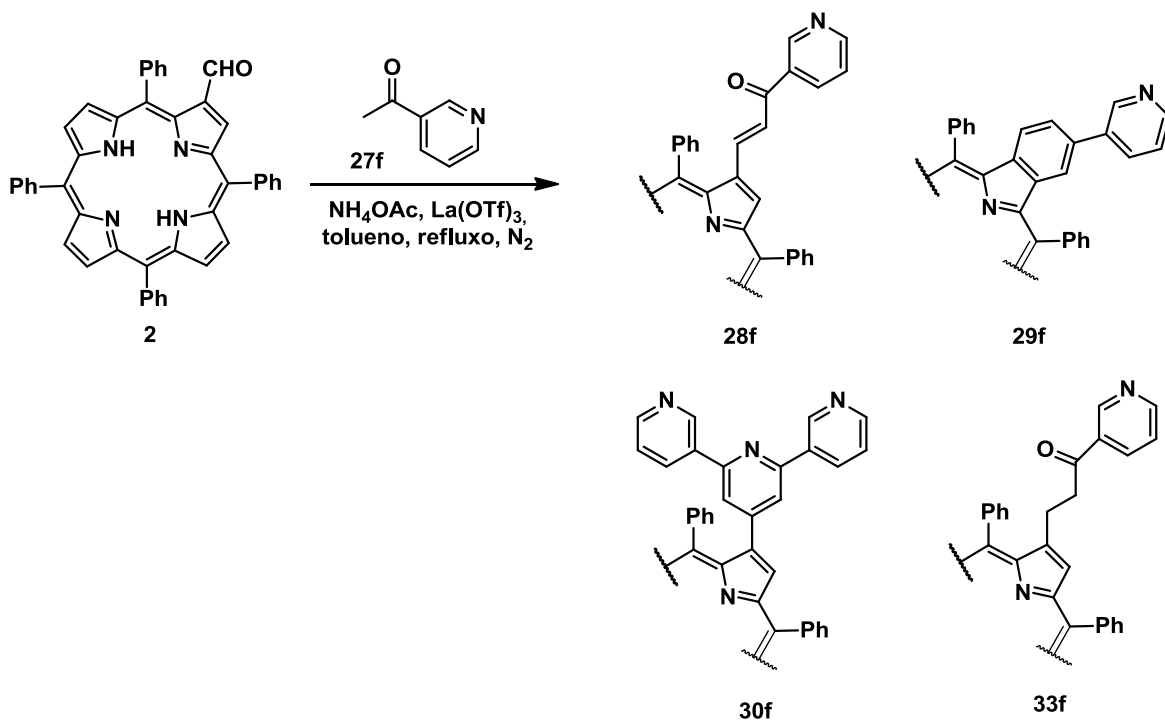
Prosseguindo os estudos realizados no domínio da funcionalização do derivado 2-formil-TPP, estendeu-se este estudo a outras acetilpiridinas, com o objetivo de estudar a sua reatividade e simultaneamente avaliar a capacidade dos novos derivados do tipo porfirina-piridina serem utilizados como agentes antibacterianos. Assim, começou-se por preparar o derivado 2-formil-TPP **2** seguindo os procedimentos experimentais descritos na literatura.¹⁸ As condições reacionais utilizadas na reação de condensação aldólica com o macrociclo porfirínico **2** com diferentes acetilpiridinas [NH₄OAc, La(OTf)₃ em refluxo de tolueno e sob atmosfera de azoto] foram baseadas num método já descrito na literatura,

uma vez que as condições estabelecidas permitiram a síntese do derivado porfirina-piridina desejado com rendimentos aceitáveis.²⁶

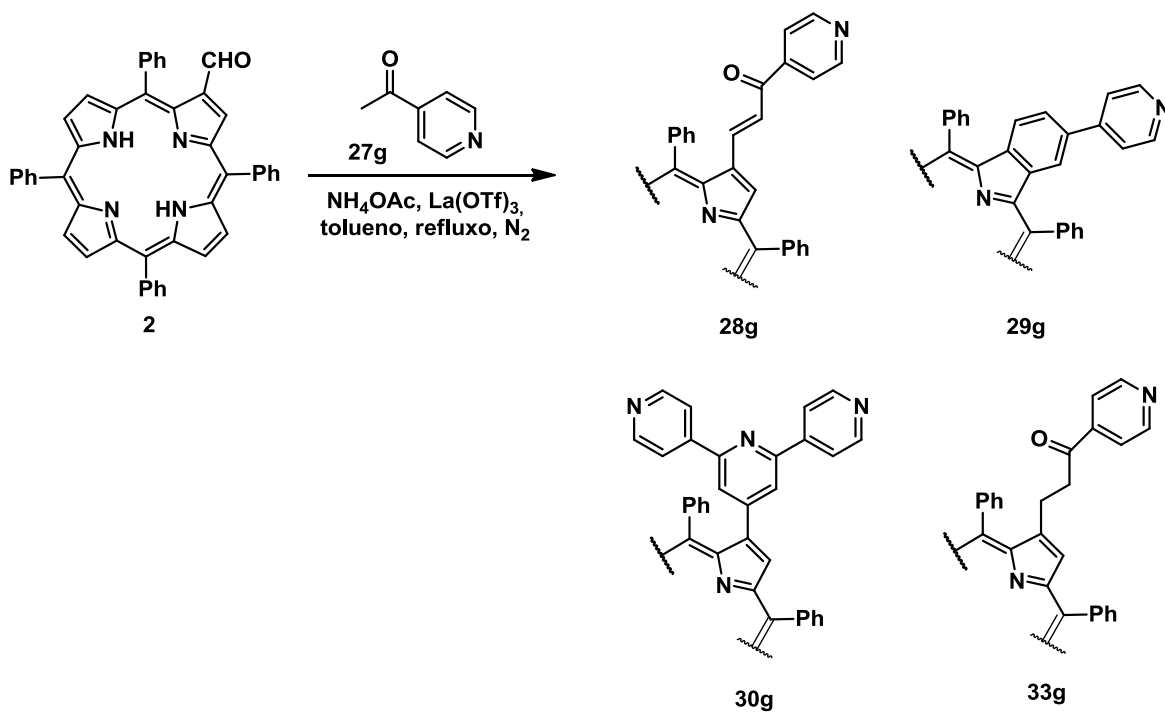
Nas reações de condensação aldólica realizadas, começou-se por adicionar NH_4OAc a uma solução de acetilpiridina **27** (2-acetilpiridina **27e**, 3-acetilpiridina **27f** ou 4-acetilpiridina **27g**) em tolueno seco e deixou-se em agitação durante 30 minutos para gerar o enolato, tendo-se, em seguida, adicionado a 2-formil-TPP **2** e o $\text{La}(\text{OTf})_3$. A mistura reacional foi colocada sob agitação a 120 °C e a sua evolução controlada por cromatografia de camada fina preparativa (TLC). Após se ter verificado o consumo total da porfirina de partida, a reação foi dada como terminada (**Esquema 20a-c**).



Esquema 20a.



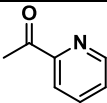
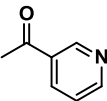
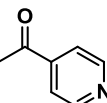
Esquema 20b.



Esquema 20c.

Em seguida, procedeu-se à lavagem da mistura reacional com uma solução de NaHCO_3 e a fase orgânica foi extraída com CHCl_3 , seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. Por fim, o resíduo resultante da mistura reacional foi purificado por cromatografia de camada fina preparativa. Os resultados obtidos neste tipo de reações com as diferentes acetilpiridinas estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Rendimentos dos produtos obtidos na reação da 2-formil-TPP **2** com diferentes acetilpiridinas.

Entrada	Cetona	Tempo (h)	28 (%)	29 (%)	30 (%)	31 (%)	32 (%)	33 (%)
e ^a		4	8	6	16	4	26	–
f ^b		6	7	23	16	–	–	7
g ^b			9	36	18	–	–	2

^a – Cetona (5 equiv.), NH_4OAc (8 equiv.).

^b – Cetona (12 equiv.), NH_4OAc (14 equiv.).

Começou-se por testar a reação de condensação aldólica entre a 2-formil-TPP com a 2-acetilpiridina **27e** (**Esquema 20a**), nas condições experimentais já descritas.²⁶ Ao fim de aproximadamente 4 horas, a reação foi terminada, seguindo os procedimentos usuais de “work-up” e após cromatografia de camada fina preparativa foram separadas cinco frações diferentes. De acordo com a bibliografia esta reação deveria originar 3 compostos distintos: um derivado do tipo porfirina-calcona **28e**, um derivado benzoporfirínico **29e** e um derivado do tipo porfirina-piridina **30e**. No entanto, durante o controlo da evolução da reação por TLC, verificou-se o aparecimento de dois novos compostos, em que o primeiro composto apresentava um R_f muito próximo do composto de partida **2** e o segundo apresentava um R_f muito próximo do derivado do tipo porfirina-piridina **30e**.

A análise por espectrometria de massa juntamente com a análise por RMN de ^1H permitiram concluir que a segunda, terceira e quarta frações isoladas se tratavam dos respetivos derivados do tipo benzoporfirina **29e** (6%), tipo calcona **28e** (8%) e tipo porfirina-piridina **30e** (16%) esperados. A análise de espectrometria de massa da fração menos polar e maioritária isolada, revelou um pico com valor de m/z 1369. Esta fração também foi analisada por RMN de ^1H , ^{13}C e técnicas bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), no entanto não foi ainda possível propor uma estrutura de forma a justificar a sua formação.

No que se refere à fração mais polar isolada, a análise de espectrometria de massa revelou um pico de m/z 846,2, sendo possível concluir após análise por RMN de ^1H , ^{13}C e técnicas bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), que esta fração é constituída por um novo derivado do tipo porfirina-piridina **31e** (**Figura 18**).

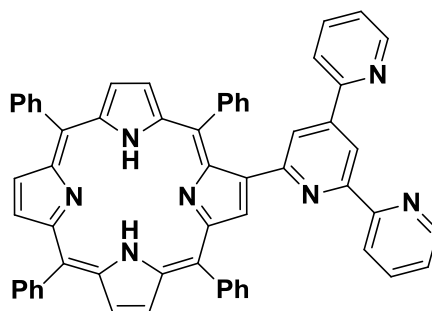


Figura 18. Estrutura do derivado do tipo porfirina-piridina **31e**.

Considerando as outras acetilpiridinas, decidiu-se verificar a eficiência do processo descrito anteriormente se mantinha quando se utilizava a 3-acetilpiridina **27f** e 4-acetilpiridina **27g**. Verificou-se que no caso da 3-acetilpiridina **27f**, a reação com a 2-formil-TPP **2** (**Esquema 20b**), realizada nas condições anteriores, dava origem ao derivado do tipo porfirina-piridina **30f** desejado com baixos rendimentos. Assim, na tentativa de aumentar esses mesmos rendimentos, decidiu-se aumentar o número de equivalentes da acetilpiridina de 5 para 12 equivalentes e do NH_4OAc de 8 para 14 equivalentes. Ao fim de 6 horas foi possível observar o consumo total da porfirina de partida e a formação de quatro produtos da reação por ordem decrescente de R_f .

Relativamente à primeira fração que foi isolada (7%), a análise de espetrometria de massa revelou um pico de m/z 748,3, sendo possível concluir após análise por RMN de ^1H e ^{13}C e técnicas bidimensionais (COSY), que esta fração representa um novo derivado do tipo porfirina-calcona reduzido **33f** (Figura 19).

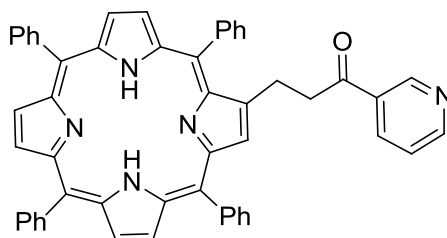


Figura 19. Estrutura do derivado do tipo porfirina-calcona reduzido **33f**.

No que se refere às três seguintes frações isoladas, a análise por espetrometria de massa em conjunto com a análise por RMN de ^1H e técnicas bidimensionais permitiram concluir que se tratavam da benzoporfirina **29f** (23%), do derivado do tipo calcona **28f** (7%) e da porfirina-piridina **30f** (16%).

Por fim, testou-se a reação com 4-acetilpiridina **27g** (Esquema 20c) nas mesmas condições anteriormente descritas. Esta reação também permitiu, ao fim de 6 horas, isolar quatro frações. No que diz respeito à primeira fração isolada (2%), a análise de espetrometria de massa, tal como no caso anterior, revelou um pico de m/z 748,3, que após análise por RMN de ^1H , foi possível confirmar tratar-se novamente um derivado do tipo porfirina-calcona reduzido **33g** (Figura 20).

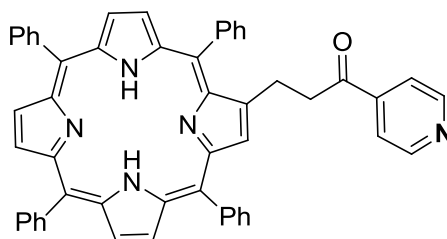
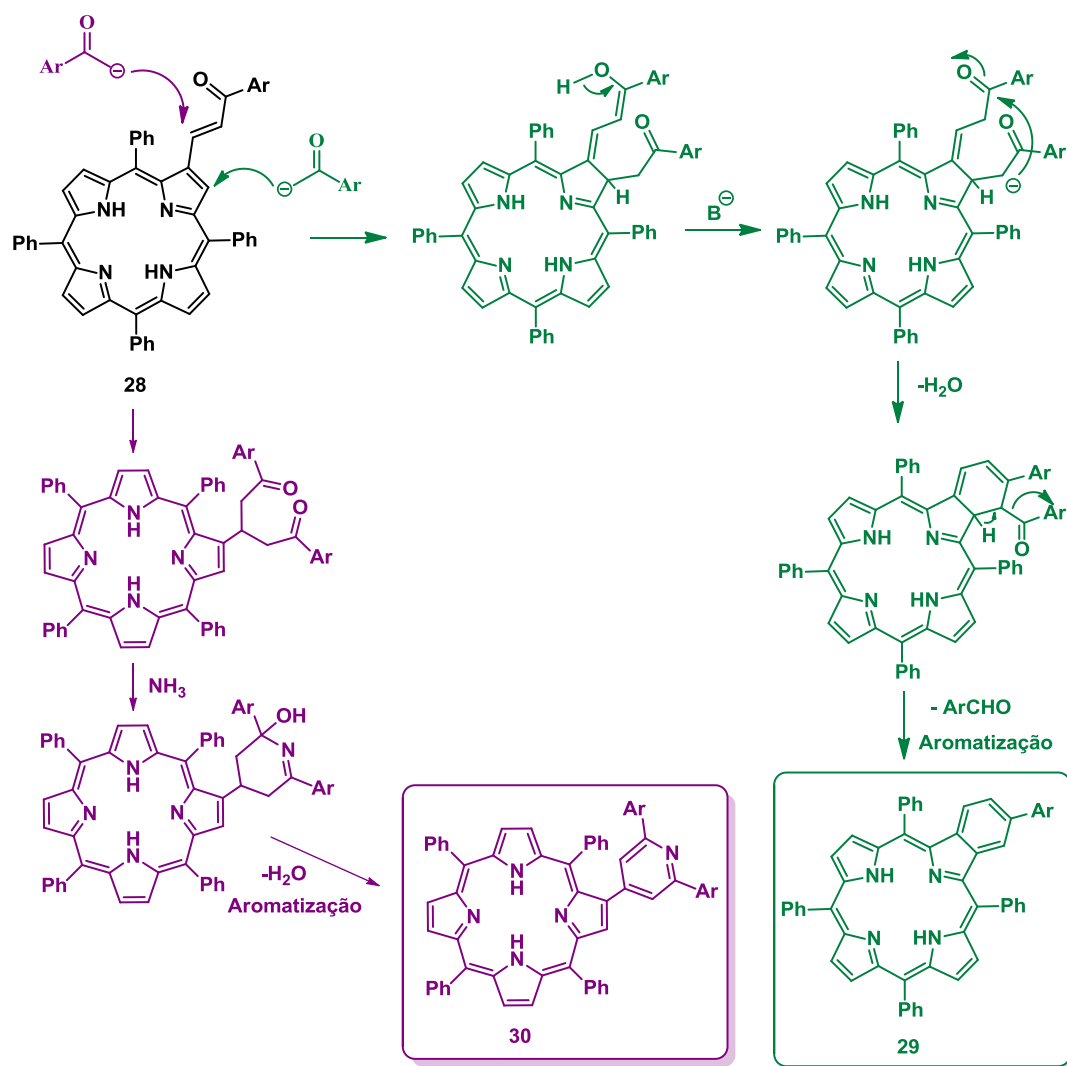


Figura 20. Estrutura do derivado do tipo porfirinas-calcona reduzido **33g**.

Relativamente às três frações seguintes isoladas foi possível concluir após a análise por espetrometria de massa juntamente com a análise por RMN de ^1H que se tratavam da benzoporfirina **29g** (36%), do derivado do tipo calcona **28g** (9%) e da porfirina-piridina **30g** (18%).

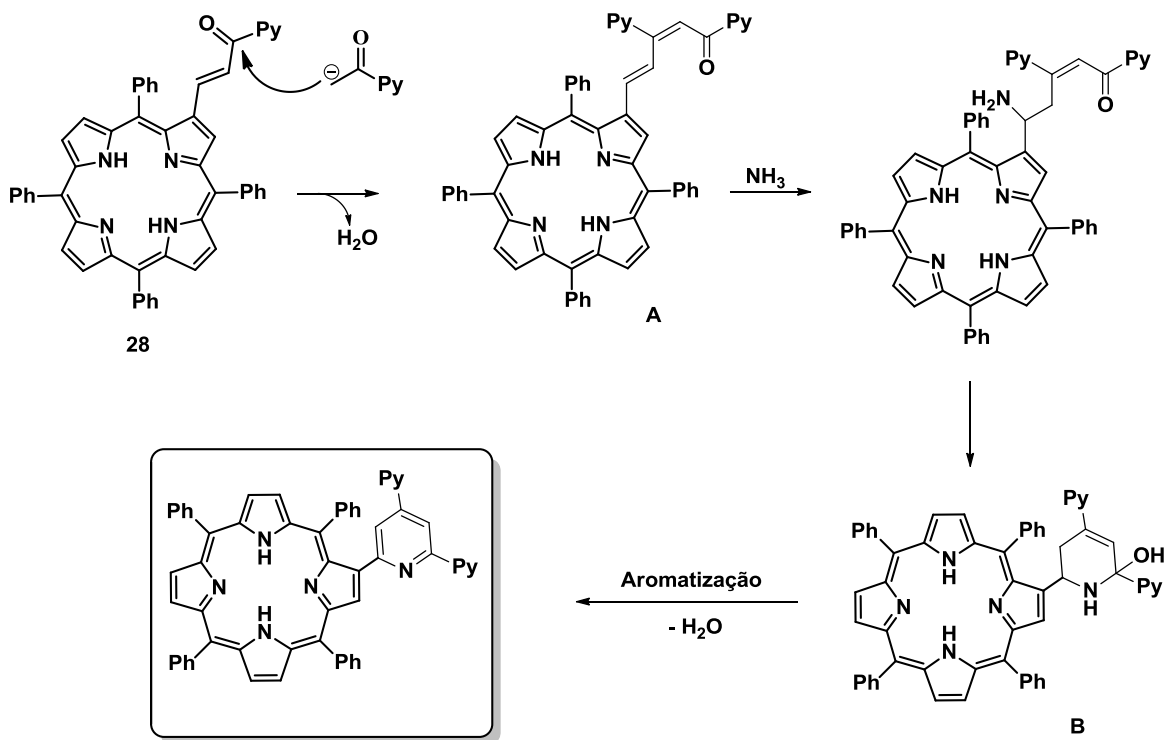
Considerações mecanísticas

Considerando que o mecanismo previamente sugerido para a formação dos derivados benzoporfirínico **29** e do tipo porfirina-piridina **30** envolvia a formação prévia do derivado do tipo porfirina-calcona **28** (**Esquema 21**),²⁶ é provável que o novo derivado porfirínico **31** se forme de acordo com proposta apresentada no **Esquema 22**.



Esquema 21.

O mecanismo mais provável deverá envolver i) a condensação aldólica entre uma molécula de enolato e o derivado do tipo porfirina-calcona **28** com desidratação, ii) a reação da espécie **A** formada com amoníaco com subsequente formação do heterocíclico e iii) a desidratação e aromatização do intermediário **B**.



Esquema 22.

Elucidação Estrutural

Os compostos sintetizados e descritos neste capítulo, foram caracterizados por espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC) e espectroscopia de UV-Vis.

Como já foi referido anteriormente, os derivados do tipo porfirina-calcona **28e**, benzoporfirínicos **29e** e porfirina-piridina **30e** já se encontram caracterizados na literatura.^{3,26} No entanto, de modo a confirmar as suas estruturas foi realizada RMN de ^1H em conjugação com técnicas bidimensionais, neste caso em concreto, COSY (**Anexo 1 – Anexo 6**).

• Derivados do tipo porfirina-calcona, 28f-g

Na **Figura 21** é apresentado, como exemplo dos derivados do tipo porfirina-calcona sintetizados nesta dissertação, o espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-calcona **28f**.

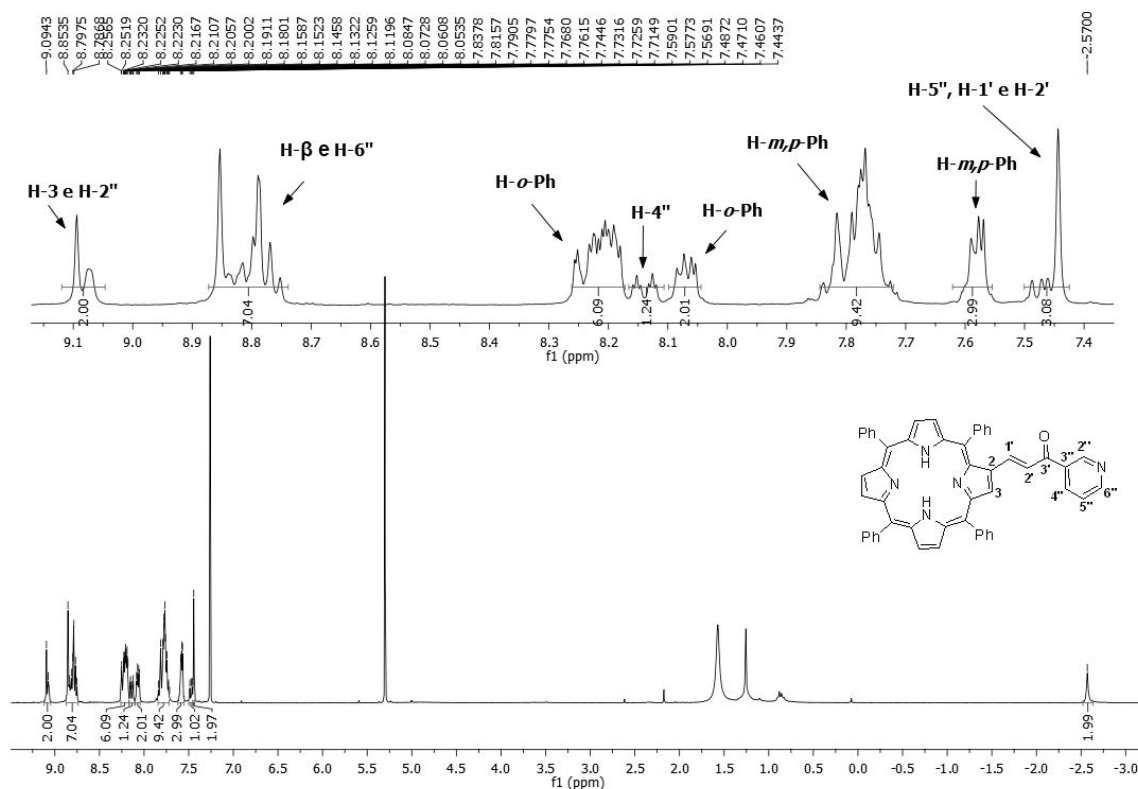


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-calcona **28f** em CDCl_3 e correspondentes expansões.

O sinal que surge a um campo mais elevado, entre δ 9,09 e δ 9,07 ppm, na forma de um multipeto com integração para 2 protões, corresponde às ressonâncias do protão H-3 do macrociclo porfirínico e do protão H-2'' do anel piridina. Este é seguido por um conjunto de sinais, na forma de um multipeto e com integração para 7 protões, entre δ 8,85 e δ 8,75 ppm, que correspondem à ressonância dos restantes protões das posições *beta* pirrólicas (H-7, H-8, H-12, H-13, H-17 e H-18) e do protão H-6'' do anel piridina. Os sinais gerados pela ressonância dos protões das posições *orto* dos grupos fenilo das posições *meso* do macrociclo surgem na forma de dois multipletos, um entre δ 8,26 e δ

8,18 ppm e o outro entre δ 8,08 e δ 8,05 ppm. No que diz respeito aos sinais correspondentes à ressonância dos prótons *meta* e *para* dos grupos fenilo das posições *meso*, estes surgem também na forma dois multipletos. O primeiro multipeto, com integração para 9 prótons, surge entre δ 7,84 e δ 7,72 ppm, enquanto o segundo surge entre δ 7,59 e δ 7,57 ppm, com integração para 3 prótons. Os sinais correspondentes à ressonância dos prótons da ligação dupla adjacente ao grupo carbonilo, H-1' e H-2', surgem juntamente com o sinal da ressonância do próton H-5'' do anel piridina, na forma de um multipeto, entre δ 7,49 e δ 7,44 ppm. No entanto, em alguns casos é possível verificar que o sinal referente à ressonância destes prótons, H-1' e H-2', surge na forma de um sistema AB, enquanto o sinal correspondente à ressonância do próton H-5'' surge na forma de um duplo duplo dupeto.

A identificação inequívoca dos sinais gerados pelas ressonâncias dos prótons das posições indicadas na **Figura 21**, como H-2'', H-4'', H-5'' e H-6'' do anel piridina, só foi possível recorrendo à análise do espectro de COSY, que é apresentado na **Figura 22**.

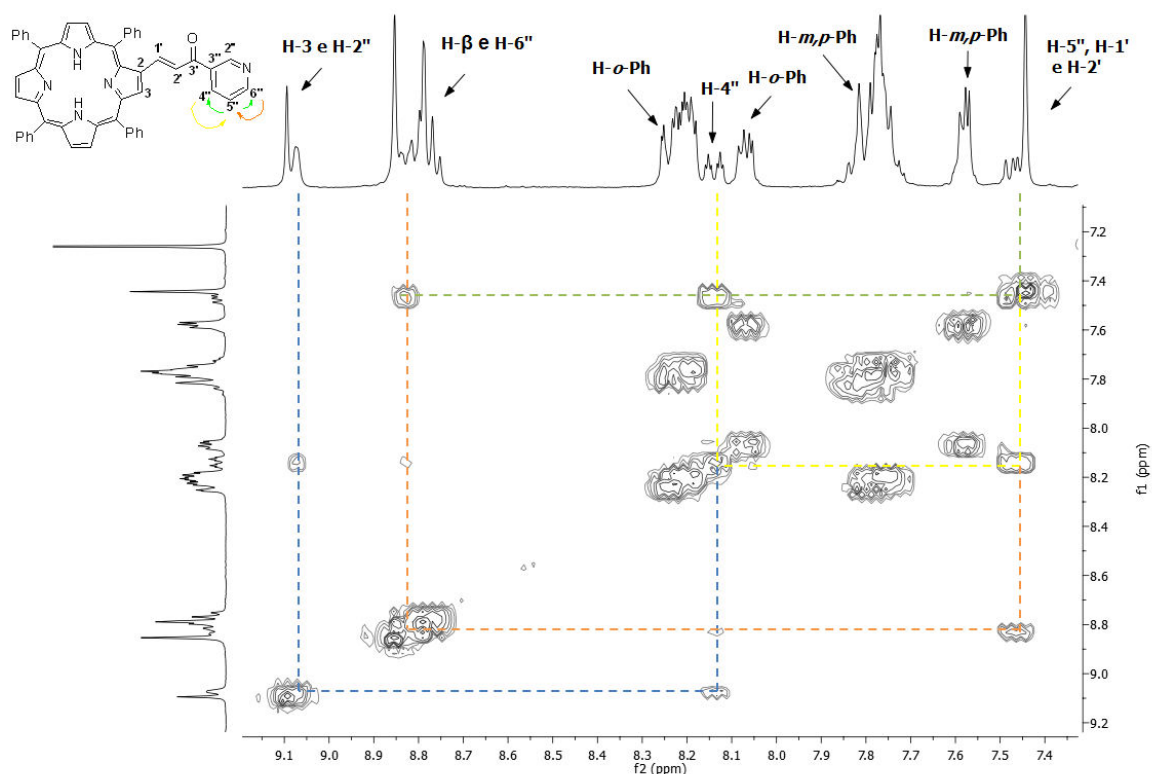


Figura 22. Expansão do espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do derivado do tipo porfirina-calcona **28f** em CDCl_3 .

Neste espectro podemos observar que o sinal correspondente à ressonância do próton H-2'', que ocorre juntamente com o sinal referente à ressonância do próton H-3, acopla a longa distância com o sinal correspondente à ressonância do próton H-4'', que surge na forma de um duplo triplete a δ 8,14 ppm ($J = 1,9$ e $7,9$ Hz). Por sua vez, este último acopla com o sinal que surge na forma de um multiplete entre δ 7,49 e δ 7,44 ppm, referente à ressonância do próton H-5'' e que surge juntamente com o sinal correspondente à ressonância dos prótons da ligação dupla adjacente ao grupo carbonilo, H-1' e H-2'. É também possível verificar um acoplamento a longa distância deste sinal com o sinal relativo à ressonância do próton H-6'', que surge na forma de um multiplete entre δ 8,85 e δ 8,75 ppm.

Uma característica muito importante dos derivados do tipo porfirina-calcona **28** está relacionada com seus espectros de RMN de ^{13}C . Os espectros de RMN de ^{13}C destes derivados apresentam um sinal a aproximadamente δ 190 ppm, que é correspondente à ressonância do grupo carbonilo da acetilpiridina (**Figura 23**).

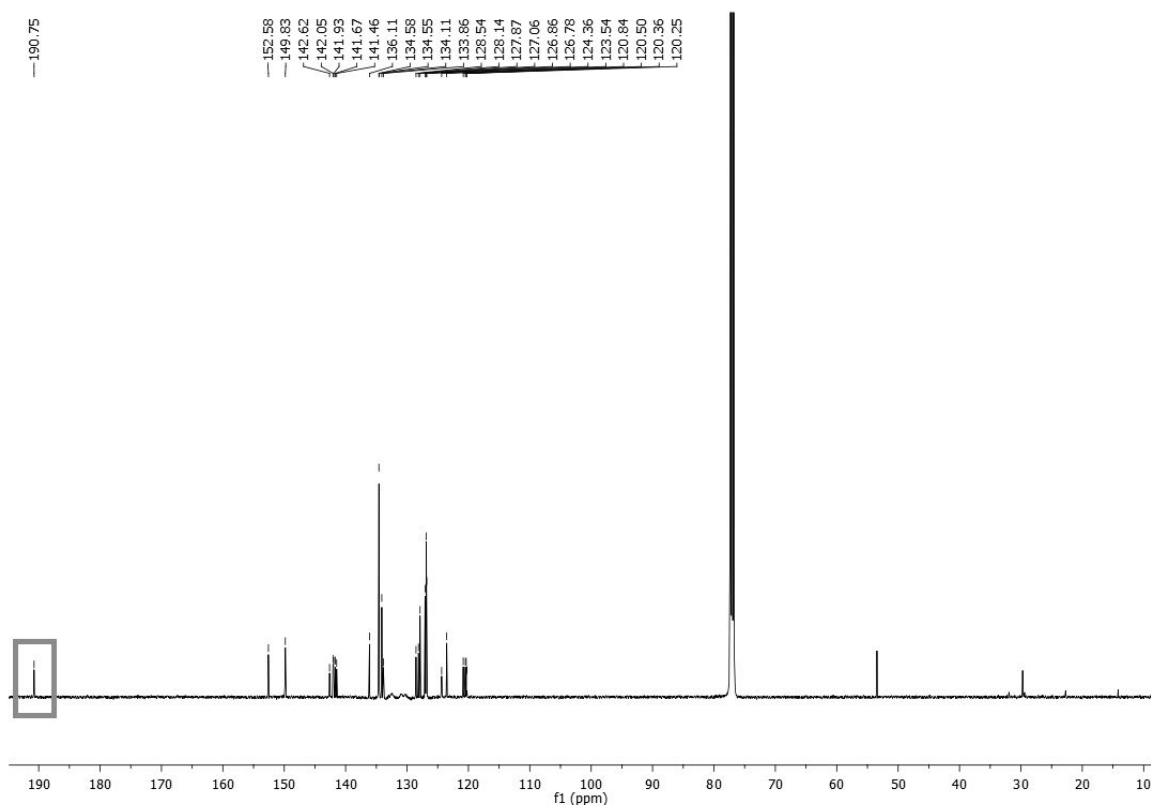


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C derivado do tipo porfirina-calcona **28f** em CDCl_3 .

Relativamente ao derivado do tipo porfirina-calcona **28g**, os espetros de RMN de ^1H destes compostos mostram um perfil muito semelhante ao observado para o composto **28f** descrito (**Anexo 9**), principalmente no que diz respeito aos sinais da ressonância dos prótons *beta* pirrólicos (δ 9,10 e δ 8,77 ppm) e prótons dos grupos fenilo das posições *meso* do macrociclo (H-*o*-Ph – δ 8,25-8,18 ppm e δ 8,06-8,03 ppm; H-*m,p*-Ph – δ 7,84-7,72 ppm e δ 7,55-7,53 ppm). A maior diferença entre estes dois espetros reside nos sinais referentes à ressonância dos prótons do grupo piridina, uma vez que o derivado do tipo porfirina-calcona **28g** apresenta uma maior simetria estrutural. Esta simetria faz com que os sinais referentes à ressonância dos prótons H-2'' e H-6'' surjam juntamente com os sinais correspondentes à ressonância dos prótons *beta* pirrólicos (δ 8,86 e δ 8,77 ppm), enquanto os sinais referentes à ressonância dos prótons H-3'' e H-5'' surgem em conjunto na forma de um multipletto (δ 7,61 e δ 7,59 ppm). Tal como no caso anterior, a aquisição dos espetros de RMN de duas dimensões foi imprescindível para a atribuição inequívoca da ressonância dos prótons H-3'', H-4'', H-5'' e H-6'' do anel piridina (**Anexo 10**).

• Derivados benzoporfirínicos, 29f-g.

Na **Figura 24** é apresentado, a título de exemplo o espetro de RMN de ^1H do derivado benzoporfirínico **29f**. O espetro caracteriza-se pela presença de quatro dupletos ($J = 4,8$ Hz) e ainda um sinal com uma multiplicidade de sistema AB ($J = 4,8$ Hz). Estes sinais são referentes à ressonância dos prótons das posições *beta* pirrólicas do macrociclo (H-7, H-8, H-12, H-13, H-17 e H-18).

Relativamente aos sinais gerados pela ressonância dos prótons dos grupos fenilo das posições *meso* do macrociclo porfirínico, estes surgem na forma de multipletos nas zonas típicas do espetro deste tipo de derivados e já referidas anteriormente para os derivados do tipo porfirina-calcona **28** (H-*o*-Ph entre δ 8,24 e δ 8,21 ppm; H-*m,p*-Ph entre δ 7,95 e δ 7,75 ppm). No que diz respeito aos sinais correspondentes à ressonância dos prótons H-1' e H-3', estes surgem juntamente com o sinal da ressonância dos prótons das posições *meta* e *para* dos grupos fenilo das posições *meso* do macrociclo.

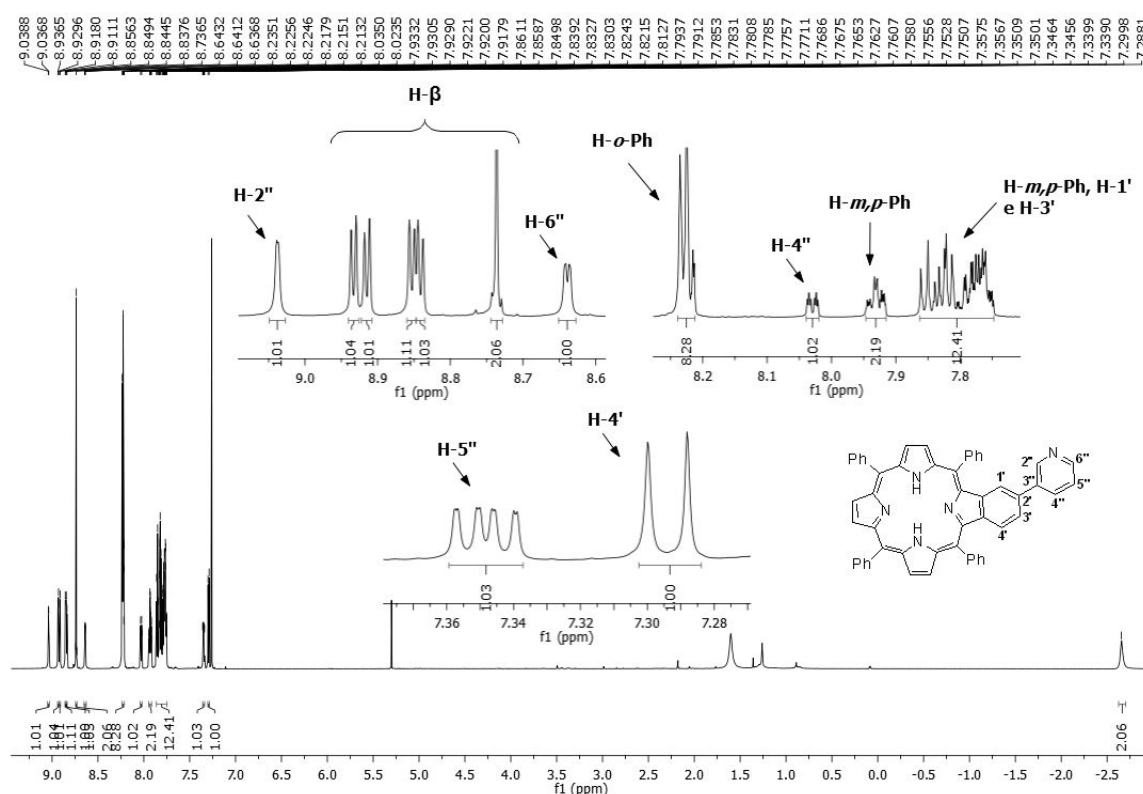


Figura 24. Espetro de RMN de ^1H do derivado benzoporfirínico **29f** em CDCl_3 e correspondentes expansões.

Os sinais gerados pelas ressonâncias dos prótons das posições indicadas na **Figura 24**, como H-2'', H-4'', H-5'' e H-6'' do anel piridina *meta*-substituído apresentam o mesmo perfil e sinais característicos com desvios químicos idênticos ao descrito para o mesmo grupo nos derivados do tipo porfirina-calcona. Tal como no caso anterior, a aquisição do espectro de RMN de duas dimensões (COSY) foi imprescindível para a identificação inequívoca dos sinais (**Anexo 12**).

Quanto ao derivado benzoporfirínico **29g**, este apresenta um perfil muito semelhante ao derivado benzoporfirínico mencionado anteriormente, principalmente no que diz respeito aos sinais referentes à ressonância dos prótons *beta* pirrólicos e dos prótons dos grupos fenilo das posições *meso*. Relativamente aos sinais gerados pelas ressonâncias dos prótons do anel piridina *meta*-substituído, estes sinais apresentam um perfil semelhante aos descritos para o mesmo grupo no derivado do tipo porfirina-calcona (**Anexo 16 e 17**).

• Derivados do tipo porfirina-piridina, 30f-g.

Na **Figura 25** é apresentado, como exemplo dos derivados do tipo porfirina-piridina sintetizados, o espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-piridina **30f**.

O sinal que surge a um campo mais elevado, δ 9,31 ppm, na forma de um duplete ($J = 1,7$ Hz) e com integração para dois prótons, corresponde à ressonância dos prótons H-2'' do anel piridina. Este é seguido por um sinal que surge como um sistema AB entre δ 8,91 e δ 8,89 ppm ($J = 4,8$ Hz) referente à ressonância de dois prótons *beta* pirrólicos do macrociclo. O sinal correspondente à ressonância dos restantes prótons *beta* pirrólicos surge na forma de um multipletto entre δ 8,85 e δ 8,79 ppm.

Os sinais gerados pela ressonância dos prótons dos grupos fenilo das posições *meso* do macrociclo surgem, novamente, nas zonas dos espectros já referidas anteriormente (H-*o*-Ph – δ 8,28-8,23 ppm e δ 8,02-8,01 ppm; H-*m,p*-Ph – δ 7,81-7,75 ppm e δ 7,17-7,14 ppm).

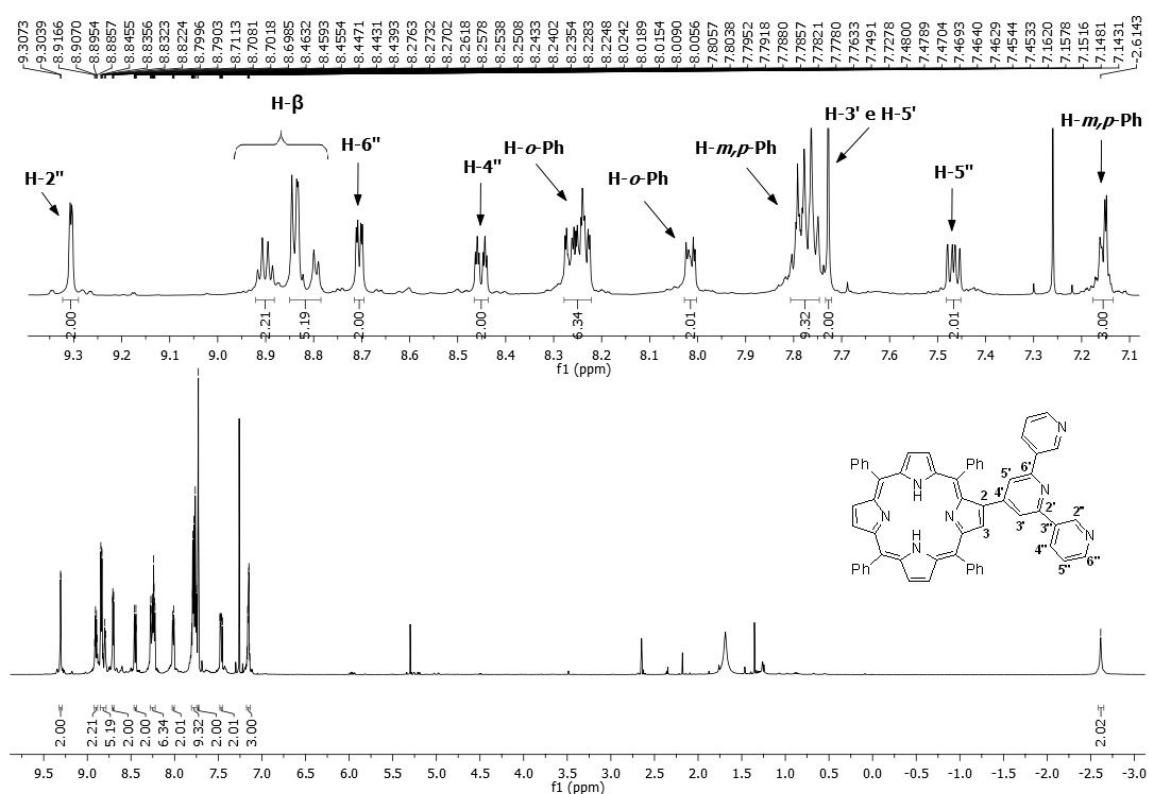


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-piridina **30f** em CDCl_3 e correspondentes expansões.

Relativamente aos prótons do anel piridina na posição *beta* pirrólica, identificou-se um singlete a δ 7,73 ppm com integração para 2 prótons que corresponde à ressonância dos prótons H-3' e H-5'.

Os sinais gerados pelas ressonâncias dos prótons das posições indicadas na **Figura 25**, como H-2'', H-4'', H-5'' e H-6'' do anel piridina *meta*-substituído apresentam um perfil análogo e sinais característicos com desvios químicos idênticos aos descritos anteriormente. Tal como no caso anterior, a aquisição do espectro de RMN de duas dimensões (COSY) foi imprescindível para a identificação inequívoca dos sinais (**Anexo 21**).

Relativamente ao derivado do tipo porfirina-piridina **30g**, o espectro de RMN de ^1H (**Anexo 25**) deste composto mostra um perfil análogo, principalmente no que diz respeito aos sinais da ressonância dos prótons *beta* pirrólicos e prótons dos grupos fenilo das posições *meso*. Tal como já foi mencionado anteriormente para o grupo dos derivados do tipo porfirina-calcona, a maior diferença entre estes dois espectros reside nos sinais referentes à ressonância dos prótons do grupo piridina. Os sinais referentes à ressonância dos prótons do anel piridina apresentam um perfil semelhante ao descrito anteriormente para os derivados do tipo porfirina-calcona e a sua identificação inequívoca, mais uma vez, só foi possível recorrendo ao espectro COSY (**Anexo 26**).

• Derivado do tipo porfirina-piridina, **31e**.

Na **Figura 26** é apresentado o espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-piridina **31e**. O espectro deste derivado porfirínico apresenta um perfil muito semelhante ao espectro de RMN de ^1H do derivado **30e** já descrito na literatura.^{3,26}

O sinal que surge a um campo mais elevado, δ 9,05 ppm, na forma de um singlete corresponde à ressonância do próton H-3 do macrociclo porfirínico. Este é seguido por um conjunto de sinais, geralmente, na forma de um multipeto e que integra para 5 prótons, entre δ 8,87 e δ 8,82 ppm, referente à ressonância de 5 prótons das posições *beta* pirrólicas. O outro próton da posição *beta* pirrólica surge juntamente com o sinal da ressonância dos prótons H-6'' do anel piridina e do próton H-3', na forma de um multipeto

entre δ 8,76 e δ 8,73 ppm. A ressonância dos prótons das posições *orto* dos grupos fenilo das posições *meso* do macrociclo, surgem em dois sinais distintos. O primeiro sinal surge na forma de um multipeto entre δ 8,27 e δ 8,20 ppm, com integração para 6 prótons. O segundo sinal surge na forma de um duplete a δ 7,98 ppm e com integração para 2 prótons ($J = 6,0$ Hz). Relativamente à ressonância dos prótons *meta* e *para* dos grupos fenilo, estes surgem em três sinais bastante distintos. O primeiro sinal surge como um multipeto entre δ 7,78 e δ 7,70 ppm; o segundo surge na forma de um triplete a δ 7,03 ppm ($J = 7,6$ Hz) e o terceiro surge na forma de um triplete a δ 6,97 ppm ($J = 7,6$ Hz).

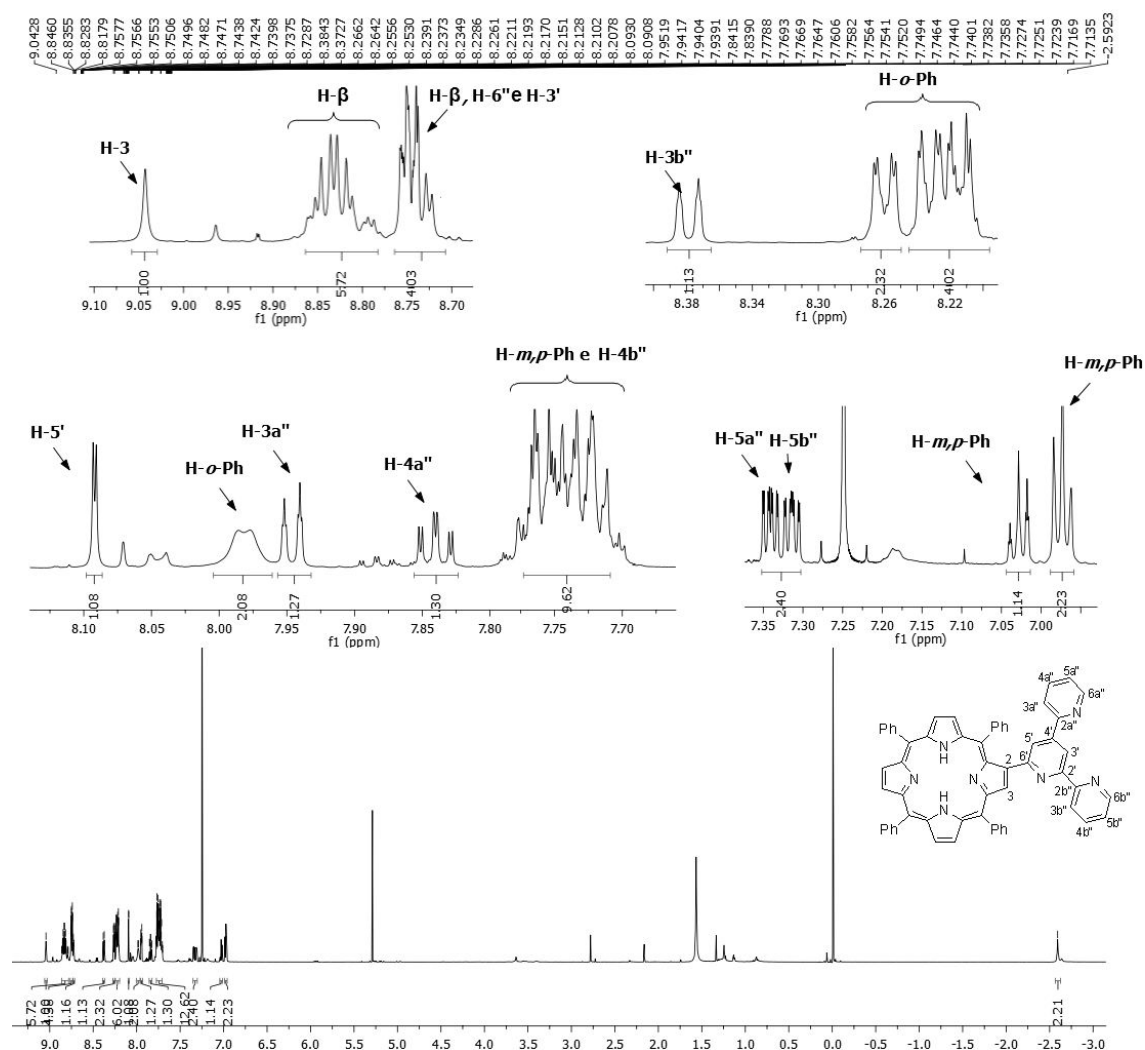


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-piridina **31e** em CDCl_3 e correspondentes expansões.

A identificação inequívoca dos sinais gerados pelas ressonâncias dos prótons das posições indicadas na **Figura 26**, como H-3a'', H-3b'', H-4a'', H-4b'', H-5a'', H-5b'', H-6a'' e H-6b'' do anel piridina *orto*-substituído, só foi possível recorrendo à análise do espectro de COSY, que é apresentado na **Figura 27**. Neste podemos observar que o sinal correspondente à ressonância dos prótons H-6a'' e H-6b'' ocorre juntamente com o sinal correspondente à ressonância dos prótons das posições *beta* pirrólicas do macrociclo e que acopla com os sinais referentes às ressonâncias dos prótons H-5a'' e H-5b'', que surgem na forma de dois multipletos. O sinal referente à ressonância do próton H-5a'' acopla com o sinal que surge na forma de um duplo triplete a δ 7,84 ppm, referente à ressonância do próton H-4a'' ($J = 1,8$ e $8,0$ Hz). E este último acopla com o sinal que surge a δ 7,95 ppm, na forma de um duplete ($J = 8,0$ Hz), correspondente ao sinal do próton H-3a''. Por outro lado, o sinal referente à ressonância do próton H-5b'' acopla com o sinal referente à ressonância do próton H-4b'' que ocorre juntamente com o sinal correspondente à ressonância dos prótons *meta* e *para* dos grupos fenilo. Por sua vez, este acopla com o sinal referente à ressonância do próton H-3b'' que surge na forma de um duplete a δ 8,38 ppm ($J = 8,1$ Hz).

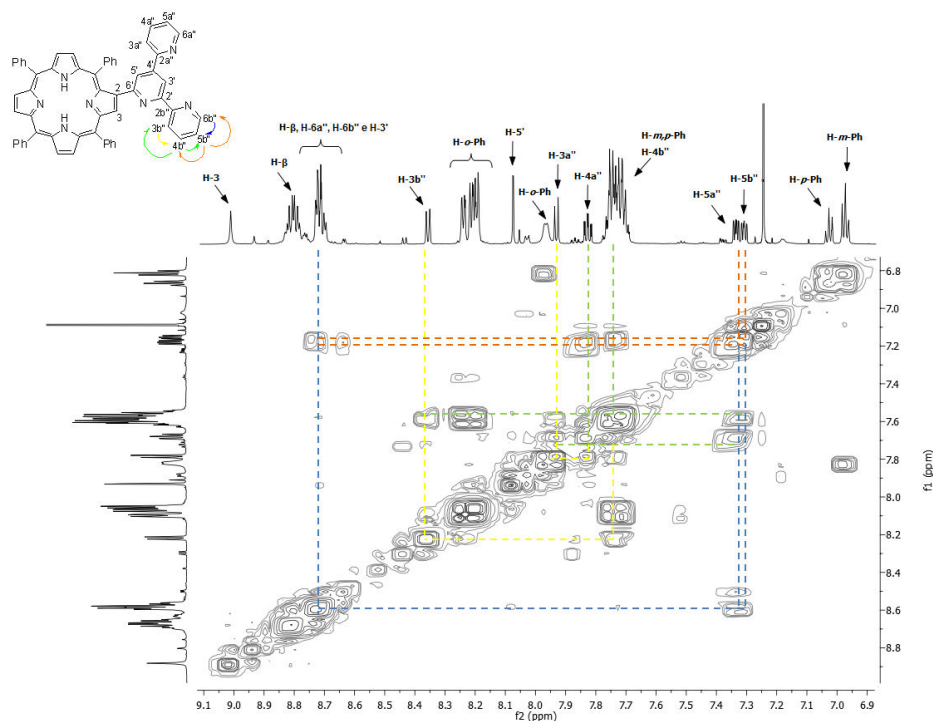


Figura 27. Expansão do espectro COSY do derivado do tipo porfirina-piridina **31e** em CDCl_3 .

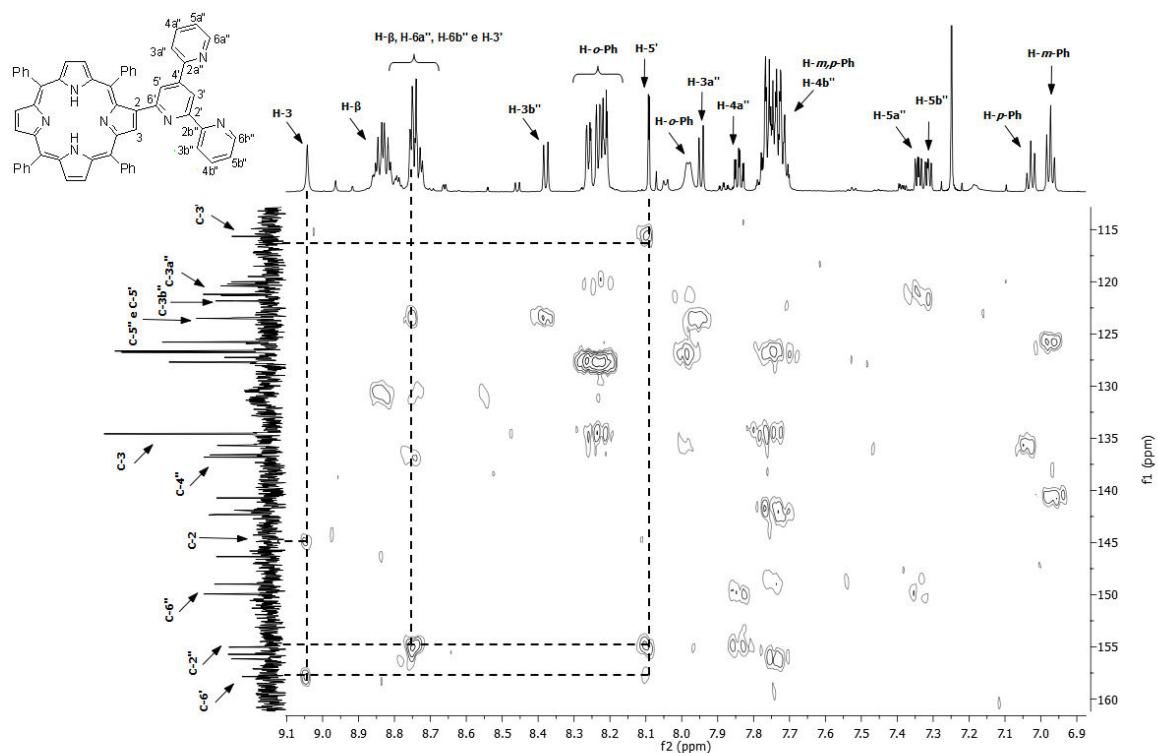


Figura 29. Expansão do espectro HMBC do derivado do tipo porfirina-piridina **31e** em CDCl_3 .

• Derivados do tipo porfirina-calcona reduzidos, **33f-g**

Na **Figura 30** é apresentado, a título de exemplo dos derivados do tipo porfirina-calcona reduzidos isolados, o espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-calcona reduzido **33f**. O espectro de RMN de ^1H deste derivado porfirínico apresenta um perfil semelhante ao descrito anteriormente para o derivado do tipo porfirina-calcona **28f**. A única diferença no espectro entre este derivado e o anteriormente descrito está na zona alifática, uma vez que surge um sinal na forma de multiplete referente à ressonância dos quatro prótons adjacentes ao grupo carbonilo.

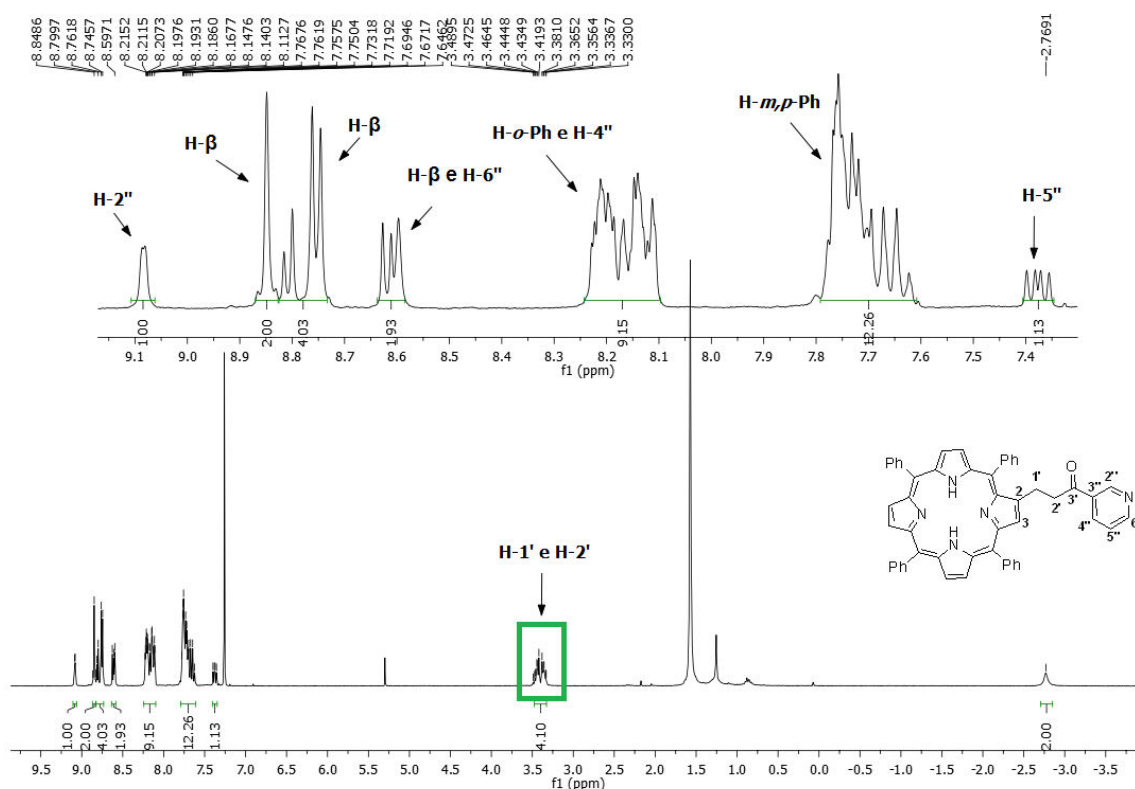


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-calcona reduzido **33f** e correspondentes expansões.

Após a análise do espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-calcona reduzido **33g**, foi possível verificar-se o mesmo comportamento (**Anexo 31**).

Para além da análise por ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e técnicas bidimensionais), estes derivados porfirínicos também foram caracterizados por espectroscopia de UV-Vis observando-se, no geral, que os seus espectros de absorção são típicos de *meso*-tetra-arylporfirinas (**Figura 31**).

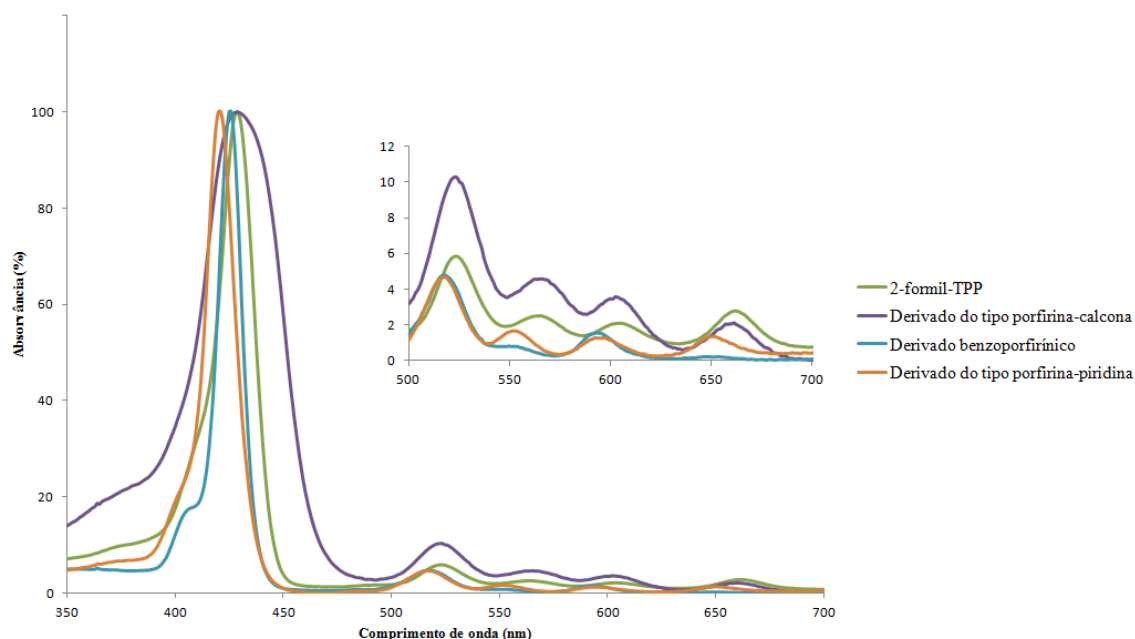


Figura 31. Espectros de absorção dos derivados do tipo porfirina-calcona **28e**, benzoporfirínicos **29e** e porfirina-piridina **30e** em DMF.

No que se refere aos espectros de absorção dos derivados porfirina-calcona **28**, estes apresentam espectros muito semelhantes ao espectro de absorção do composto de partida (**2-formil-TPP**), com uma banda bastante intensa a 429 nm (banda *Soret*) e quatro bandas Q entre 500 nm e 700 nm. É também importante realçar que a banda *Soret* observada para estes derivados porfirínicos apresenta um alargamento significativo relativamente à mesma banda para o composto de partida.

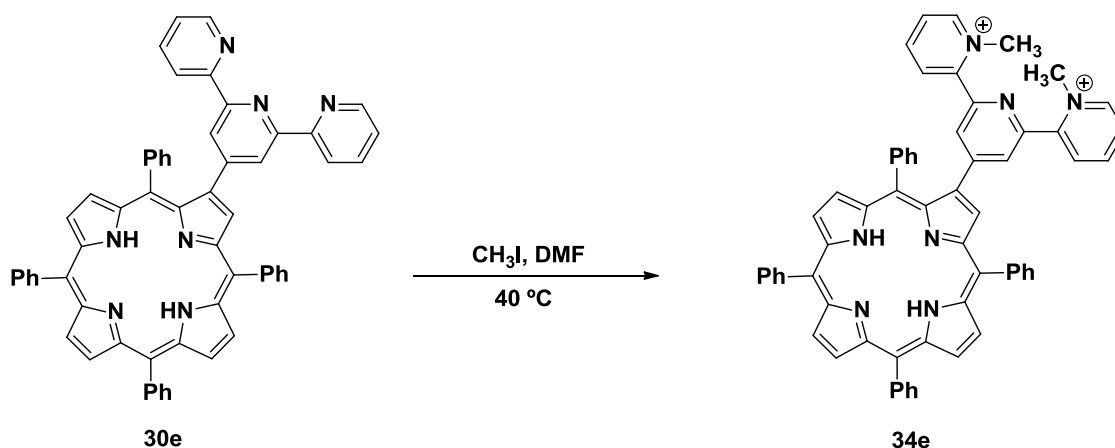
No caso dos derivados do tipo porfirina-piridina **30**, a banda *Soret* surge a 421 nm, apresentando deste modo um desvio hipsocrómico de 8 nm relativamente ao composto de partida. Relativamente às quatro bandas Q entre 500 nm e 700 nm, é possível observar também um desvio para valores de comprimento de onda menores.

Já no que diz respeito aos espectros de absorção dos derivados benzoporfirínicos **29**, estes mostram um perfil diferente ao observado para o composto de partida. O espectro de absorção destes derivados é caracterizado pela presença de uma banda *Soret* e duas bandas Q. A banda *Soret* surge a 426 nm, com um desvio hipsocrómico de 3 nm relativamente à

banda *Soret* do composto de partida, enquanto as duas bandas Q surgem entre 500 nm e 600 nm, característica de derivados benzoporfirínicos.

2.3.2. Estudos de cationização dos derivados do tipo porfirina-piridina 30

Tendo como objetivo a preparação de derivados do tipo porfirina-piridina catiónicos para posterior aplicação em fotoinativação de microrganismos, procedeu-se à cationização dos diferentes derivados do tipo porfirina-piridina sintetizados **30e-g**. No **Esquema 23**, é demonstrado a título de exemplo a reação de cationização do derivado do tipo porfirina-piridina **30e**.



Esquema 23.

As reações de cationização dos derivados do tipo porfirina-piridina **30e-g** foram realizadas num tubo selado, em DMF seco e com adição de um excesso de iodeto de metilo. A mistura reacional foi mantida sob agitação a 40 °C durante 120 horas. Findo esse tempo, procedeu-se à precipitação do composto final cationizado com adição de éter dietílico e subsequente filtração e lavagem do precipitado com o mesmo solvente. Por fim, dissolveu-se o precipitado numa mistura de diclorometano/metanol (9:1), o solvente foi evaporado a pressão reduzida e posteriormente procedeu-se à cristalização em CH₂Cl₂/Hexano. É de salientar que, uma vez que a reação foi realizada com um excesso de iodeto de metilo, adicionou-se dietilamina ao filtrado, de forma a destruir todo o iodeto de

metilo que possa não ter reagido. Os resultados obtidos nas reações de cationização com os diferentes derivados do tipo porfirina-piridina **30e-g** são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Rendimentos obtidos na reação de cationização dos derivados do tipo porfirina-piridina **30e-g**.

Entrada	Derivado do tipo porfirina-piridina, 30e-g	Tempo (h)	Derivado do tipo porfirina-piridina catiónico, 34e-g (%)
1	30e		70
2	30f	120	76
3	30g		74

Os derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo sintetizados foram caracterizados por espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e técnicas bidimensionais) e espectroscopia de UV-Vis.

Na **Figura 32** é apresentado, como exemplo dos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo sintetizados, o espectro de RMN de ^1H do derivado **34e**. O espectro deste derivado catiónico apresenta um perfil análogo ao descrito anteriormente para o mesmo derivado na sua forma não catiónica. No entanto, o neste caso observa-se um sinal na forma de singuleto a aproximadamente δ 4,5 ppm e com integração para 6 prótons, referente à ressonância dos prótons de dois grupos metilo. A análise de espectrometria de massa revelou um pico de m/z 860, correspondente ao ião molecular com perda de um grupo metilo. Também é possível observar um pico de m/z 874 correspondente ao ião molecular com menos um próton.

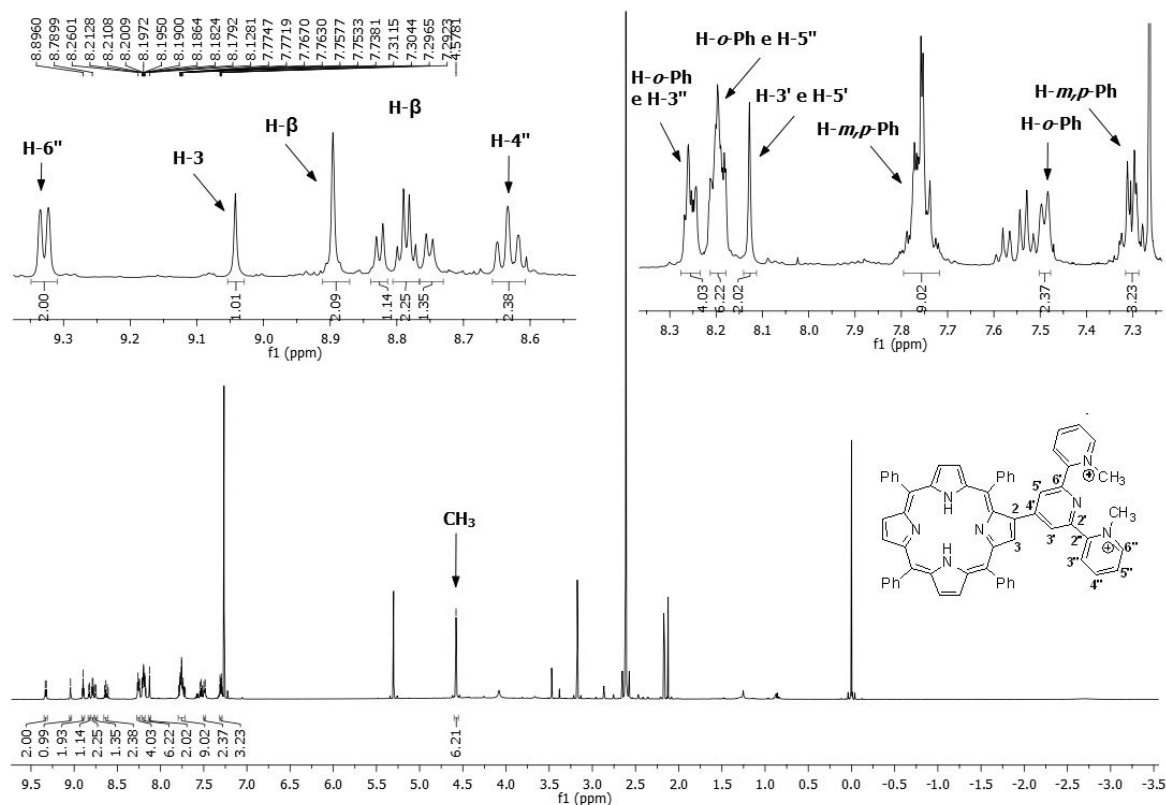


Figura 32. Espetro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-piridina catiónico **34e** em $\text{CDCl}_3/\text{MeOH D}_4$ e correspondentes expansões.

Tal como nos casos anteriores, a identificação inequívoca dos sinais gerados pela ressonância dos prótons do anel piridina só foi possível com a aquisição do espectro COSY (**Anexo 32**).

Para além da análise por ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e técnicas bidimensionais), estes derivados porfirínicos também foram caracterizados por espectroscopia de UV-Vis observando-se, no geral, que os seus espectros de absorção são típicos de *meso*-tetra-arilporfirinas (**Figura 33**).

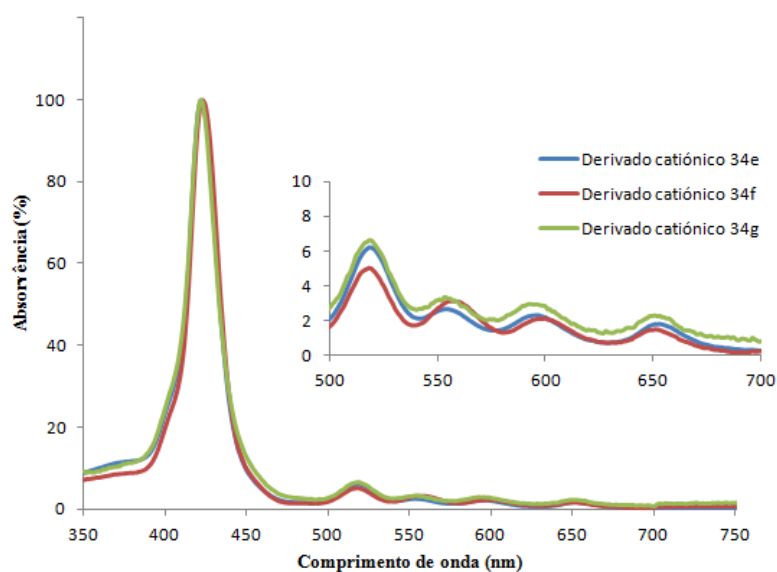


Figura 33. Espectro de absorção dos novos derivados catiónicos **34** β -funcionalizados com grupos piridilo em DMF.

Quando se compara o espectro de absorção destes derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo com os seus respetivos derivados não catiónicos, verifica-se que a introdução das cargas não origina alteração no espectro de absorção (**Figura 34**).

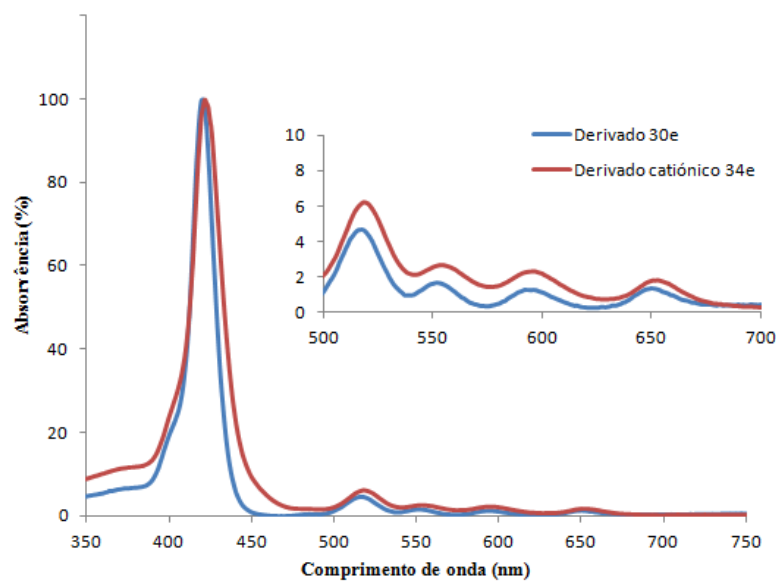


Figura 34. Espectro de absorção do derivado do tipo porfirina-piridina **30e** e do respetivo derivado catiónico **34e** em DMF.



2.4. Conclusão

Este capítulo teve como principal objetivo estender os estudos realizados no domínio da funcionalização da 2-formil-TPP **2** via condensação aldólica a diferentes acetilpiridinas. As condições reacionais utilizadas foram baseadas em condições reportadas na literatura²⁶, uma vez que estas condições permitiam a síntese dos derivados porfirina-piridina desejados com rendimentos aceitáveis.

Do trabalho desenvolvido, pode-se concluir que a reação de condensação aldólica entre a 2-formil-TPP e as diferentes acetilpiridinas utilizadas permite sintetizar derivados do tipo porfirina-calcona **28**, benzoporfirinas **29** e tipo porfirina-piridina **30**. No entanto, dependendo da acetilpiridina utilizada os resultados são consideravelmente diferentes.

No caso da reação com 2-acetilpiridina, verificou-se a formação de dois novos compostos pela primeira vez reportados nesta reação, o derivado do tipo porfirina-piridina **31** e um novo derivado que acreditamos se tratar de uma estrutura dimérica. A formação destes derivados, de certa forma, influenciou os rendimentos dos derivados benzoporfirínico **29**, do tipo calcona **28** e porfirina-piridina **30** obtidos, uma vez que foram significativamente mais baixos do que os reportados na literatura.²⁶

Já no que diz respeito à reação com 3-acetilpiridina e 4-acetilpiridina, verificou-se a formação de um derivado do tipo porfirina-calcona reduzido **33** para além dos derivados esperados. A formação deste novo derivado pode estar relacionada com as condições do meio reacional. Os rendimentos obtidos para os derivados do tipo porfirina-calcona **28f** e **28g** são de aproximadamente 10%. Relativamente aos derivados benzoporfirínicos **29f-g** e derivados do tipo porfirina-piridina **30f-g**, é possível verificar que quando se utiliza a 4-acetilpiridina estes derivados formam-se com melhores rendimentos, apesar da diferença entre eles não ser significativa. Assim, podemos concluir que a posição do nitrogénio no anel piridina influencia a formação destes derivados.

Com o objetivo de sintetizar derivados β -funcionalizados com grupos piridilo tricationicos, os derivados **30e-g** foram cationizados. No entanto, apenas foi possível a introdução de dois grupos metilo e consequentemente a formação de um derivado com dupla carga positiva com propriedades adequadas para uma potencial aplicação na fotoinativação de microrganismos.

2.5. Seção experimental

2.5.1. Anotações gerais

Os reagentes comerciais, de diferentes marcas, utilizados neste trabalho não sofreram qualquer purificação prévia à sua utilização uma vez que os seus graus de pureza assim o permitiram. Os solventes utilizados nas diferentes etapas de síntese e cristalização eram analiticamente puros ou foram, sempre que necessário, purificados de acordo com os procedimentos descritos na literatura.

A *N,N*-dimetilformamida (DMF) utilizada como solvente nas reações foi seca, por aquecimento a refluxo, sobre MgSO_4 e posteriormente destilada a pressão reduzida. Permaneceu armazenada em peneiros moleculares de 4 Å previamente ativados. O tolueno utilizado como solvente nas reações foi previamente seco em fio de sódio. Os solventes comerciais utilizados nos processos de purificação foram previamente destilados e, no caso do diclorometano, clorofórmio e tolueno, passados por óxido de alumínio neutro (Merck).

As reações foram seguidas por cromatografia em camada fina (TLC), utilizando folhas plásticas revestidas por sílica gel 60 (Merck). As purificações das misturas reacionais foram realizadas por coluna com sílica gel 60 de 0,063-0,200 mm (Merck) ou por cromatografia de camada fina preparativa. As placas de cromatografia utilizadas eram de vidro (20 x 20 cm), previamente revestidas com uma camada de sílica gel 60 (Merck), com uma espessura de 0,5 mm e posteriormente ativadas na estufa a 100 °C durante 12 h.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C realizados na Universidade de Aveiro foram registados num aparelho Bruker DRX 300 Avance, Bruker DRX 500 Avance ou Bruker DRX 700 Avance, operando a uma frequência de 300,13 MHz, 500,13 MHz e 700,75 MHz para ^1H e 75,47 MHz, 125, 77 MHz e 176,2 MHz para ^{13}C . O solvente utilizado para a aquisição dos espectros foi, na maioria, o clorofórmio deuterado (CDCl_3) e o padrão interno utilizado foi tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0$ ppm). No entanto, quando se utilizou outro tipo de solvente, este aparece devidamente identificado. Nas descrições do RMN de ^1H , além do desvio químico, também se indica a multiplicidade dos sinais e as correspondentes constantes de acoplamento (J , Hz). Os assinalamentos inequívocos das ressonâncias dos prótons e carbonos foram efetuados com recurso à técnica bidimensional de COSY e em alguns casos também às técnicas HSQC e HMBC.

Os espectros de massa obtidos por MALDI, realizados na Universidade de Aveiro, foram efetuados num espectrómetro MALDI-TOF-TOF 4800 Applied Biosystems MDS Sciex, usando como solvente clorofórmio e sem matriz. Os dados de massa são apresentados em termos de razão de m/z .

Os espectros de UV-Vis realizados na Universidade de Aveiro foram registados num espectrofotómetro UV-2501PC Shimadzu, utilizando células de vidro de percurso ótico de 1 cm, usando DMF como solvente.

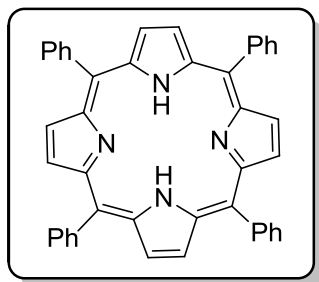
2.5.2. Procedimento experimental

A síntese das porfirinas utilizadas como material de partida nas reações realizadas durante este capítulo foi realizada de acordo com procedimentos experimentais reportados na literatura. No entanto, para que a parte experimental deste documento fique completa, permitindo a reprodutibilidade da mesma, a síntese destes derivados porfirínicos será descrita pormenorizadamente.

2.5.2.1. *Síntese da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP)*

Num balão de fundo redondo com duas tubuladuras, equipado com um condensador, adicionou-se a uma mistura de ácido acético (120 mL) e nitrobenzeno (70 mL), benzaldeído (5,88 mL). De seguida, adicionou-se, gota a gota, 4 mL de pirrol, através de um funil de carga protegido da luz. A mistura reacional manteve-se em refluxo a 120 °C, durante uma hora e sob agitação magnética. Após esse tempo, o aquecimento foi desligado, a mistura reacional deixada a arrefecer e subsequentemente procedeu-se à cristalização da porfirina desejada com a adição de metanol. Os cristais obtidos foram filtrados sob vácuo com um funil de placa porosa e secos na estufa (60 °C). A 5,10,15,20-tetrafenilporfirina foi obtida pura e com um rendimento de 26% (2,326 g, 3,79 mmol).

5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP)



RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8,91 (s, 8H, H- β), 8,28-8,23 (m, 8H, H-*o*-Ph), 7,87-7,74 (m, H-*m,p*-Ph), -2,71 (s, 2H, NH) ppm. **UV-Vis (DMF):** $\lambda_{\text{máx}}$ (%) 416 (100%), 513 (4,4%), 547 (2,1%), 589 (1,4%), 646 (1,6%) nm. **MS (MALDI):** m/z 614,2 $[\text{M}]^+$.

2.5.2.2. Síntese da 5,10,15,20-tetrafenilporfirinatocobre(II) (TPP-Cu(II))

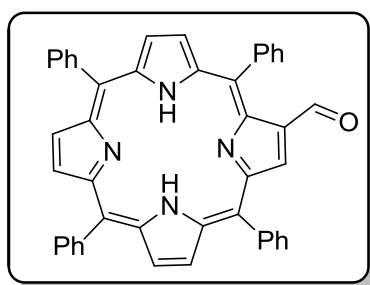
Num balão de fundo redondo, contendo uma solução de 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (1 g, 1,63 mmol) em CHCl_3 (125 mL) e metanol (40 mL) foi adicionado acetato de cobre(II) mono-hidratado (1,5 equivalentes, 487 mg, 2,4 mmol). A mistura reacional foi colocada a 50 °C no evaporador rotativo sem vácuo, durante 30 min. Findo esse tempo, procedeu-se à cristalização da porfirina desejada com a adição de hexano à mistura reacional. Os cristais obtidos foram filtrados sob vácuo com um funil de prego e secos na estufa (60 °C). A 5,10,15,20-tetrafenilporfirinatocobre(II) foi obtida pura e com um rendimento de 65% (725 mg, 1,07 mmol). **UV-Vis (DMF):** $\lambda_{\text{máx}}$ (%) 414 (100%), 538 (4,4%), 615 (0,9%) nm. **MS (MALDI):** m/z 675,2 $[\text{M}]^+$.

2.5.2.3. Síntese de 2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirina (2-formil-TPP)

A uma solução de complexo de cobre(II) de 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (500 mg, 0,740 mmol) dissolvida em 1,2-dicloroetano (50 mL) adicionou-se em simultâneo a *N,N*-dimetilformamida (5 mL) e o cloreto de fosforilo previamente destilado (5 mL). A mistura reacional foi deixada a 80 °C, em refluxo e sob agitação durante a noite. Findo esse tempo e após o arrefecimento da mistura reacional até à temperatura ambiente, procedeu-se à adição de ácido sulfúrico (10 mL), mantendo-se a mistura em agitação durante 30 min. De seguida, verteu-se a mistura reacional numa solução aquosa saturada de KOH que se encontrava num banho de gelo, até se verificar alteração da cor da solução de verde para vermelho. A mistura reacional foi lavada com água destilada e a fase orgânica extraída com CHCl_3 . Em seguida, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente

evaporado a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por coluna cromatográfica com sílica gel usando tolueno como eluente. Foram isoladas três frações: a fração menos polar foi identificada por TLC como a porfirina de partida (TPP), a segunda fração foi identificada como o complexo de cobre(II) formilado e a terceira fração foi identificada como sendo a porfirina formilada (2-formil-TPP). Esta foi deixada a cristalizar numa mistura de CHCl_2 /Hexano. Os cristais obtidos foram filtrados por vácuo, usando um funil de prego e lavados com hexano. A 2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirina foi obtida pura e com um rendimento de 67% (0,3202 g, 0,499 mmol).

2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirina (2-formil-TPP)



RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 9,35 (s, 1H, CHO), 9,16 (s, 1H, H-3), 8,87-8,80 (m, 4H, H- β), 8,71 (AB, 2H, $J = 5,1$ Hz, H- β), 8,19-8,12 (m, 8H, H-*o*-Ph), 7,77-7,66 (m, 12H, H-*m,p*-Ph), -2,62 (s, 2H, NH) ppm. **UV-Vis (DMF):** $\lambda_{\text{máx}}$ (%) 429 (100%), 523 (5,8%), 565 (2,5%), 605 (2,1%), 662 (2,8%) nm. **MS (MALDI):** m/z 642,1 $[\text{M}]^+$.

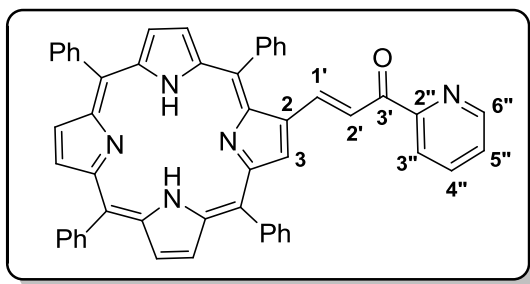
2.5.2.4. Reação de condensação aldólica da 2-formil-TPP com diferentes acetilpiridinas

2.5.2.4.1. Síntese do derivado do tipo porfirina-piridina 30e

Num balão de fundo redondo adicionou-se acetato de amónio (8 equivalentes, 38,3 mg, 0,50 mmol) a uma solução de 2-acetilpiridina (5 equivalentes) em tolueno seco (2 mL). Esta mistura foi deixada em agitação durante 30 minutos, tendo-se, em seguida, adicionado a 2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirina (40 mg, 62,3 μmol) e $\text{La}(\text{OTf})_3$ (20 mol %, 7,3 mg, 12,5 μmol). A mistura reacional foi colocada sob agitação a 120 $^\circ\text{C}$ e a sua evolução controlada por TLC. Após se ter verificado o consumo total da porfirina de partida, a reação foi dada como terminada. A mistura reacional foi lavada com uma solução de NaHCO_3 , de forma a eliminar o ácido acético formado durante a reação, e a fase orgânica extraída com CHCl_3 . Em seguida, a fase orgânica foi seca com sulfato de

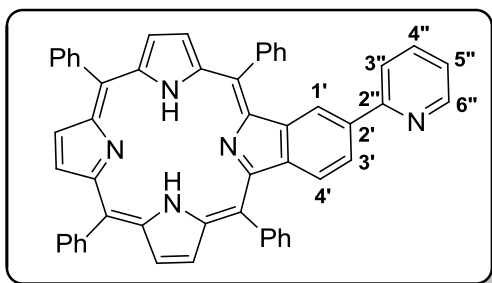
sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. O resíduo resultante da mistura reacional foi purificado por cromatografia de camada fina preparativa, utilizando como eluente diclorometano. Foram recolhidas 5 frações, da menos polar para a mais polar: dímero **32e** – 26%, benzoporfirina **29e** – 6%, calcona **28e** – 8%, a terpiridina **30e** – 16% e terpiridina **31e** – 4%.

2-[3-Oxo-3-(piridin-2-il)prop-1-en-1-il]-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 28e.



RMN de ^1H (700 MHz, CDCl_3): δ 9,17 (1H, s, H-3), 8,83-8,80 (6H, m, H- β), 8,76 (1H, d, J = 4,6 Hz, H-6''), 8,24-8,20 (7H, m, H-*o*-Ph e H-3''), 8,15 (2H, d, J = 8,0 Hz, H-*o*-Ph), 7,90 (1H, dt, J = 1,7 e 7,6 Hz, H-4''), 7,82-7,71 (14H, m, H-*m,p*-Ph, H-1' e H-2'), 7,51 (1H, ddd, J = 1,1, 4,6 e 7,6 Hz, H-5''), - 2,56 (2H, s, NH) ppm. **RMN de ^{13}C (176 MHz, CDCl_3):** δ 189,5 (C=O), 154,7, 148,8, 142,2, 142,0, 141,8, 141,5, 141,3, 137,1, 134,6, 134,6, 134,6, 134,4, 128,7, 128,0, 127,8, 127,2, 126,8, 126,8, 126,6, 123,1, 122,5, 120,7, 120,4, 120,4, 120,2 ppm. **UV-Vis** (DMF): $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 429 (5,13), 521 (4,15), 561 (3,80), 602 (3,69), 661 (3,47) nm. **MS** (MALDI): m/z 746,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

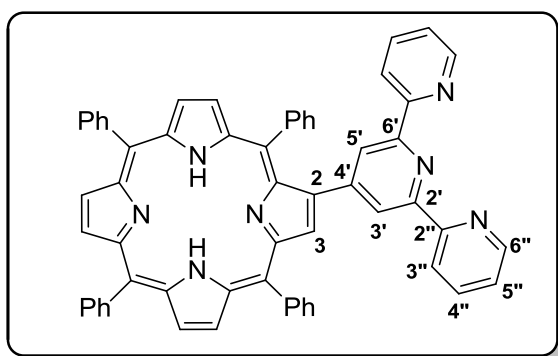
2²-(Piridin-2-il)-5,10,15,20-tetrafenilbenzo[*b*]porfirina, 29e.



RMN de ^1H (700 MHz, CDCl_3): δ 8,94 (1H, d, J = 4,8 Hz, H- β), 8,92 (1H, d, J = 4,8 Hz, H- β), 8,88 (1H, d, J = 4,8 Hz, H- β), 8,84 (1H, d, J = 4,8 Hz, H- β), 8,75 e 8,74 (2H, AB, J = 4,8 Hz, H- β), 8,65-8,64 (1H, d, J = 4,3 Hz, H-6''), 8,49 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-3'), 8,28-8,22 (8H, m, H-*o*-Ph), 7,93-7,75 (14H, m, H-*m,p*-Ph, H-1', H-3''), 7,73 (1H, dt, J = 1,7 e 7,2 Hz, H-4''), 7,30 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-4'), 7,28 (1H, ddd, J = 1,3, 4,3 e 7,2 Hz, H-5''), -2,63 (2H, s, NH) ppm. **RMN de ^{13}C (176 MHz, CDCl_3):** δ 159,5, 156,7, 154,7, 153,75, 148,8, 148,2, 147,4, 143,3,

142,2, 142,0, 141,9, 140,3, 139,0, 138,0, 136,4, 134,8, 134,7, 134,5, 134,2, 134,0, 134,0, 133,6, 132,6, 128,6, 128,2, 128,0, 127,8, 127,8, 127,0, 126,8, 126,8, 126,5, 126,5, 123,5, 122,2, 121,2, 117,9, 117,8, 117,7 ppm. **UV-Vis** (DMF): $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 426 (5,50), 515 (4,16), 592 (3,63) nm. **MS** (MALDI): m/z 742,2 $[M+H]^+$.

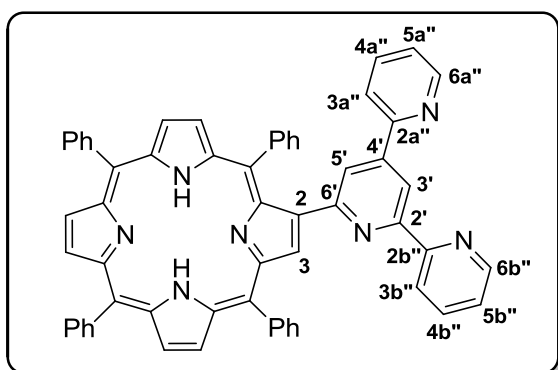
2-(2',6'-bis-(2-piridil)-piridin-4-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 30e.



RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8,90 (1H, s, H-3), 8,86-8,77 (6H, m, H- β), 8,67-8,62 (4H, m, H-3'' e H-6''), 8,38 (2H, s, H-3' e H-5'), 8,25-8,23 (6H, m, H-*o*-Ph), 7,98 (2H, d, $J = 6,6$ Hz, H-*o*-Ph), 7,91 (2H, dt, $J = 1,4$ e 7,7 Hz, H-4''), 7,78-7,73 (9H, m, H-*m,p*-Ph), 7,36-7,32 (2H, m, H-5''), 7,04-6,95

(3H, m, H-*m,p*-Ph), -2,63 (2H, s, NH) ppm. **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):** δ 156,4, 154,1, 149,1, 142,2, 141,9, 140,5, 136,7, 135,8, 134,6, 134,5, 131,6, 129,2, 127,9, 127,8, 127,6, 126,8, 126,7, 126,7, 126,0, 123,5, 122,7, 121,3, 121,0, 120,3, 120,3, 120,1 ppm. **UV-Vis** (DMF): $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 421 (5,50), 517 (4,16), 552 (3,76), 595 (3,58), 649 (3,61) nm. **MS** (MALDI): m/z 846,2 $[M+H]^+$.

2-(2',4'-bis-(2-piridil)-piridin-2-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 31e.



RMN de ^1H (700 MHz, CDCl_3): δ 9,05 (1H, s, H-3), 8,87-8,82 (5H, m, H- β), 8,76-8,73 (4H, m, H- β , H-6'' e H-3'), 8,38 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-3b''), 8,27-8,20 (6H, m, H-*o*-Ph), 8,09 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-5'), 7,98 (2H, d, $J = 6,0$ Hz, H-*o*-Ph), 7,95 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-3a''), 7,84 (1H, dt, $J = 1,8$ e 8,0 Hz, H-4a''), 7,78-7,70 (10H, m, H-*m,p*-Ph e H-4b''), 7,35-7,33 (1H, m, H-5a''), 7,32-7,30 (1H, m, H-5b''), 7,03 (1H, t, $J = 7,6$ Hz, H-*p*-Ph), 6,97 (2H, t, $J = 7,6$ Hz, H-*m*-Ph), - 2,59 (2H,

s, NH) ppm. **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):** δ 157,9, 156,1, 155,7, 155,0, 149,9, 149,0 (C-6a'' e C-6b''), 146,4, 142,3, 142,3, 141,9, 140,7, 136,8 (C-4a''), 136,6 (C-4b''), 135,7, 134,6 (C-3), 127,7, 127,2, 126,8, 126,6, 126,6, 125,8, 123,5 (C-5'), 121,8 (C-3b''), 121,3, 121,2 (C-3a''), 120,4, 120,2, 120,0, 115,6 (C-3') ppm. **UV-Vis (DMF):** $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 420 (5,46), 517 (4,18), 552 (3,72), 595 (3,62), 650 (3,52) nm. **MS (MALDI):** m/z 846,2 $[\text{M}]^+$.

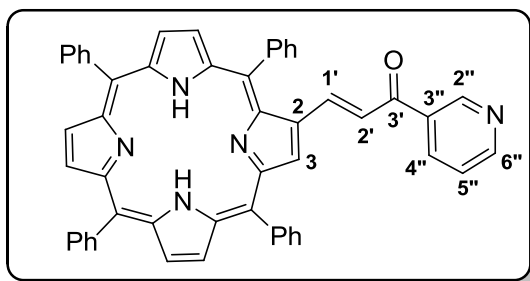
2.5.2.4.2. Síntese dos derivados do tipo porfirina-piridina, 30f e 30g

Num balão de fundo redondo adicionou-se acetato de amónia (14 equivalentes, 50,4 mg, 0,65 mmol) a uma solução da respetiva acetilpiridina, 3-acetilpiridina para o derivado **27f** e 4-acetilpiridina para o derivado **27g** (12 equivalentes), em tolueno seco (2 mL). Esta mistura foi deixada em agitação durante 30 minutos, tendo-se, em seguida, adicionado a 2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirina (30 mg, 46,7 μmol) e $\text{La}(\text{OTf})_3$ (20 mol %, 5,4 mg, 9,3 μmol). A mistura reacional foi colocada sob agitação a 120 °C e a sua evolução controlada por TLC. Após se ter verificado o consumo total da porfirina de partida, passadas 6 horas, a reação foi dada como terminada. A mistura reacional foi lavada com água destilada e extraída com CHCl_3 . Em seguida, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. O resíduo resultante da mistura reacional foi purificado por cromatografia de camada fina preparativa, utilizando diclorometano para separar as três primeiras frações e de seguida uma mistura de diclorometano/metanol (1% de metanol) para separar a fração mais polar.

Na reação da 2-formil-TPP com 3-acetilpiridina foram recolhidas 4 frações distintas, da menos polar para a mais polar: derivado calcona reduzido **33f** (7 %), derivado benzoporfirínico **29f** (23%), derivado do tipo porfirina-calcona **28f** (7%) e derivado do tipo porfirina-piridina **30f** (16%). Enquanto a reação com 4-acetilpiridina deu origem a 4 frações distintas, da menos polar para a mais polar, que correspondem ao derivado do tipo calcona reduzido **33g** (2%), derivado benzoporfirínico **29g** (36%), derivado do tipo porfirina-calcona **28g** (9%) e derivado do tipo porfirina-piridina **30g** (18%).

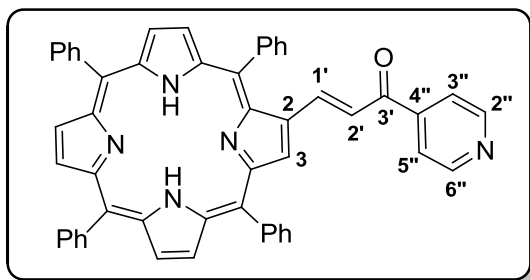
• Derivados do tipo porfirina-calcona 28f e 28g

2-[3-Oxo-3-(piridin-3-il)prop-1-en-1-il]-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 28f.



RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 9,09-9,07 (2H, m, H-3 e H-2''), 8,85-8,75 (7H, m, H- β e H-6''), 8,26-8,18 (6H, m, H-*o*-Ph), 8,14 (1H, dt, $J = 1,9$ e $7,9$ Hz, H-4''), 8,08-8,05 (2H, m, H-*o*-Ph), 7,84-7,72 (9H, m, H-*m,p*-Ph), 7,59-7,57 (3H, m, H-*m,p*-Ph), 7,49-7,44 (3H, m, H-5'', H-1' e H-2'), - 2,57 (2H, s, NH) ppm. **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 190,8 (C=O), 152,6 (C-6''), 149,8 (C-2''), 142,6 (C-1' e C-2'), 142,1, 141,9, 141,7, 141,5, 136,1 (C-4''), 134,6, 134,5, 134,1, 133,9 (C-3''), 132,5, 131,0, 130,2, 128,5, 128,1, 127,9, 127,1, 126,9, 126,8, 124,4, 123,5 (C-5''), 120,8, 120,5, 120,4, 120,2 ppm. **UV-Vis (CHCl_3):** $\lambda_{\text{máx}}$ (%) 429 (100%), 524 (11,7%), 571 (5,5%), 602 (4,8%), 661 (2,9%) nm. **MS (MALDI):** m/z 746,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

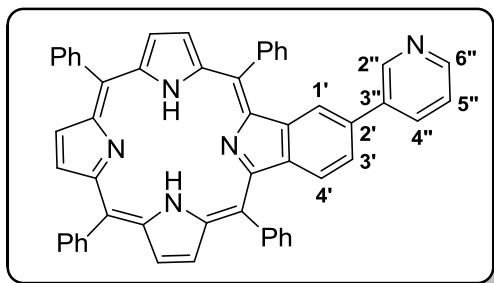
2-[3-Oxo-3-(piridin-4-il)prop-1-en-1-il]-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 28g.



RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 9,10 (1H, s, H-3), 8,86-8,77 (7H, m, H- β , H-2'' e H-6''), 8,73 (1H, d, $J = 4,9$ Hz, H- β), 8,25-8,18 (6H, m, H-*o*-Ph), 8,06-8,03 (2H, m, H-*o*-Ph), 7,84-7,72 (9H, m, H-*m,p*-Ph), 7,61-7,59 (2H, m, H-3'' e H-5''), 7,55-7,53 (3H, m, H-*m,p*-Ph), 7,42 e 7,37 (2H, AB, $J = 15,7$ Hz, H-1' e H-2'), - 2,56 (2H, s, NH) ppm. **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 192,0 (C=O), 151,0, 150,6, 150,5, 147,8, 147,2, 147,0, 146,8, 146,5, 145,8, 144,9, 144,0, 143,9, 143,8, 143,6, 142,0, 141,9, 141,6, 141,4, 140,1, 139,8, 139,6, 139,6, 139,5, 139,2, 138,9, 138,8, 134,6, 134,1, 132,7, 132,3, 130,6, 130,5, 130,2, 130,1, 129,0, 128,9, 128,8, 128,7, 128,7, 128,6, 128,5, 128,5, 128,4, 128,1, 127,9, 127,1, 126,9, 126,8, 126,8, 126,6, 124,4, 124,2, 123,5, 122,7, 122,1, 121,7, 121,3, 121,2, 120,9, 120,5, 120,4, 120,2 ppm. **UV-Vis (DMF):** $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 430 (4,93), 523 (3,96), 566 (3,55), 607 (3,38), 660 (3,00) nm. **MS (MALDI):** m/z 746,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

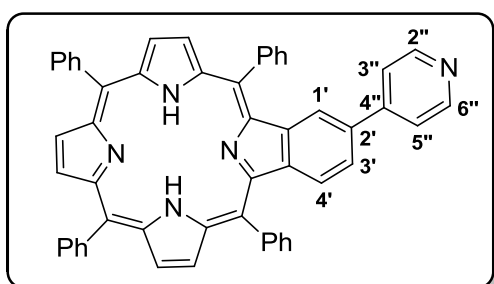
• Derivados do tipo benzoporfirínicos 29f e 29g

2²-(Piridin-3-il)-5,10,15,20-tetrafenilbenzo[b]porfirina, 29f.



RMN de ¹H (700 MHz, CDCl₃): δ 9,04 (1H, d, *J* = 1,4 Hz, H-2''), 8,93 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, H-β), 8,91 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, H-β), 8,85 (1H, d, *J* = 4,8, H-β), 8,84 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, H-β), 8,74 (2H, AB, *J* = 4,8 Hz, H-β), 8,64 (1H, dd, *J* = 1,4 e 4,6 Hz, H-6''), 8,24-8,21 (8H, m, H-*o*-Ph), 8,03 (1H, dt, *J* = 1,4 e 7,9 Hz, H-4''), 7,95-7,92 (2H, m, H-*m,p*-Ph), 7,86-7,75 (12H, m, H-*m,p*-Ph, H-1' e H-3'), 7,35 (1H, ddd, *J* = 0,6, 4,6 e 7,9 Hz, H-5''), 7,29 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, H-4'), -2,66 (2H, s, NH) ppm. **RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃):** 160,1 (C-3''), 154,8, 151,7 (C-2'), 149,7 (C-6''), 148,6 (C-2''), 147,9, 147,0, 143,1, 142,2, 142,0, 141,9, 140,2, 138,9, 138,0, 135,0 (C-4''), 134,8, 134,7, 134,5, 134,1, 133,9, 133,6, 133,3, 132,6 (C-4'), 128,7, 128,3, 128,0, 127,9, 127,8, 127,7, 127,3, 127,0, 126,8, 126,7, 126,6, 123,3 (C-5''), 121,3, 121,2, 117,8, 117,7, 116,7 ppm. **UV-Vis (DMF):** λ_{máx} (log ε) 425 (5,46), 517 (4,27), 593 (3,75) nm. **MS (MALDI):** *m/z* 742,2 [M+H]⁺.

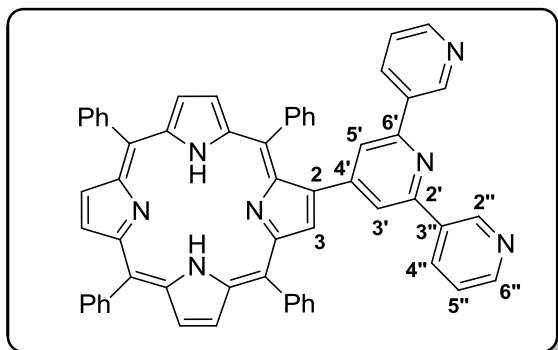
2²-(Piridin-4-il)-5,10,15,20-tetrafenilbenzo[b]porfirina, 29g.



RMN de ¹H (700 MHz, CDCl₃): δ 8,94 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, H-β), 8,92 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, H-β), 8,86 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, H-β), 8,84 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, H-β), 8,74 (2H, AB, *J* = 4,8 Hz, H-β), 8,67-8,66 (2H, m, H-2'' e H-6''), 8,25-8,21 (8H, m, H-*o*-Ph), 7,95-7,90 (2H, m, H-*m,p*-Ph), 7,86-7,53 (12H, H-*m,p*-Ph, H-1' e H-3'), 7,68-7,67 (2H, m, H-3'' e H-5''), 7,31 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-4'), -2,65 (2H, s, NH) ppm. **RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃):** δ 160,0 (C-4''), 154,9, 151,4 (C-2'), 150,1 (C-2'' e C-6''), 146,4, 143,1, 142,2, 141,9, 141,8, 134,6, 134,5, 134,2, 134,1, 133,6, 132,6 (C-4'), 128,7, 128,4, 128,1, 127,9, 127,8, 127,8, 127,3, 127,1, 126,8, 126,8, 121,4, 121,4 (C-3'' e C-5''), 121,3, 117,9, 117,8, 117,1, ppm. **UV-Vis (DMF):** λ_{máx} (log ε) 426 (4,84), 517 (4,22), 592 (3,66) nm. **MS (MALDI):** *m/z* 742,2 [M+H]⁺.

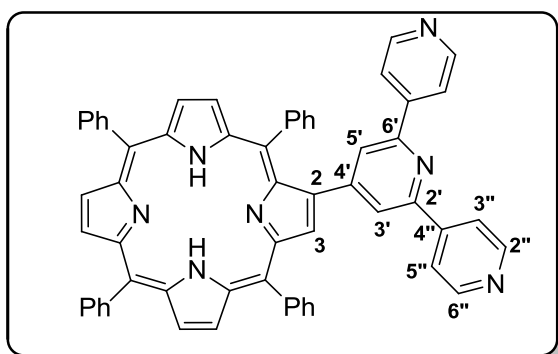
• Derivados do tipo porfirina-piridina, 30f e 30g

2-(2',6'-bis-(3-piridil)-piridin-4-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 30f.



RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 9,31 (2H, d, $J = 1,7$ Hz, H-2''), 8,91 e 8,89 (2H, AB, $J = 4,8$ Hz, H- β), 8,85-8,79 (5H, m, H- β), 8,71 (2H, dd, $J = 1,7$ e 4,8 Hz, H-6''), 8,45 (2H, dt, $J = 1,7$ e 8,1 Hz, H-4''), 8,28-8,23 (6H, m, H-*o*-Ph), 8,02-8,01 (2H, m, H-*o*-Ph), 7,81-7,75 (9H, m, H-*m,p*-Ph), 7,73 (2H, s, H-3' e H-5'), 7,47 (2H, ddd, $J = 0,6, 4,8$ e 8,1 Hz, H-5''), 7,17-7,14 (3H, m, H-*m,p*-Ph), -2,61 (2H, s, NH) ppm. **^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 153,4 (C-3''), 149,9 (C-6''), 149,5, 148,4 (C-2''), 142,2, 142,0, 141,7, 140,6, 138,9, 135,7, 134,7, 134,6, 134,5 (C-4''), 132,7, 130,6, 130,1, 128,1, 128,0, 127,9, 126,9, 126,8, 126,2, 123,6 (C-5''), 121,3 (C-3' e C-5'), 120,7, 120,7, 120,4, 120,3 ppm. **UV-Vis (DMF):** $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 420 (5,43), 516 (4,21), 552 (3,80), 595 (3,63), 648 (3,55) nm. **MS (MALDI):** m/z 846,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

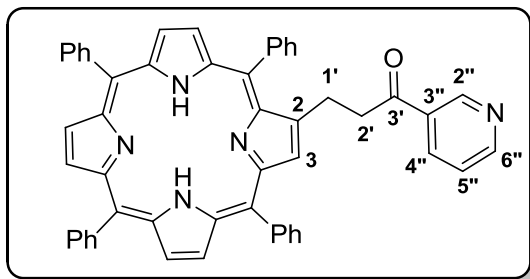
2-(2',6'-bis-(4-piridil)-piridin-4-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 30g.



RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 8,92 e 8,89 (2H, AB, $J = 4,8$ Hz, H- β), 8,85-8,83 (4H, m, H- β), 8,80-8,78 (5H, m, H- β , H-2'' e H-6''), 8,27-8,22 (6H, m, H-*o*-Ph), 8,02 (4H, dd, $J = 1,6$ e 4,6 Hz, H-3'' e H-5''), 8,00-7,97 (2H, m, H-*o*-Ph), 7,81 (2H, s, H-3' e H-5'), 7,80-7,74 (9H, m, H-*m,p*-Ph), 7,12-7,10 (3H, m, H-*m,p*-Ph), -2,62 (2H, s, NH) ppm. **^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 153,3 (C-2''), 150,7, 150,5 (C-2'' e C-6''), 149,8, 146,2 (C-4''), 142,1, 142,0, 141,7, 140,5, 135,7 (C-3'' e C-5''), 134,6, 134,5, 132,9, 130,5, 130,0, 128,1, 128,0, 127,9, 127,8, 126,9, 126,8, 126,7, 126,2, 122,4, 121,6, 121,5, 121,2 (C-3' e C-5'), 120,8, 120,6, 120,5, 120,4 ppm. **UV-Vis (DMF):** $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 421 (5,38), 516 (4,18), 552 (3,69), 592 (3,46), 651 (3,37) nm. **MS (MALDI):** m/z 846,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

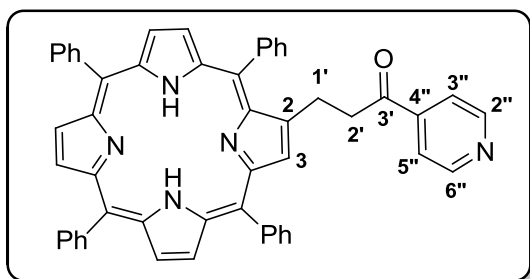
• Derivados do tipo porfirina-calcona reduzidos 33f e 33g

2-[3-Oxo-3-(piridin-3-il)propanil]-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 33f.



RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 9,08 (2H, d, $J = 1,6$ Hz, H-2''), 8,85 (2H, AB, $J = 5,2$ Hz, H- β), 8,82-8,75 (4H, m, H- β), 8,63-8,60 (2H, m, H- β e H-6''), 8,23-8,11 (9H, m, H-*o*-Ph e H-4''), 7,78-7,62 (12H, m, H-*m,p*-Ph), 7,38 (1H, dd, $J = 4,8$ e 8,0 Hz, H-5''), -2,77 (2H, s, NH) ppm. **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 197,0, 153,4, 149,6, 149,3, 146,8, 146,5, 146,2, 146,0, 145,9, 145,7, 145,1, 144,3, 142,6, 142,3, 142,0, 141,9, 139,8, 139,7, 139,4, 139,1, 138,9, 138,8, 138,5, 135,3, 135,2, 134,6, 134,5, 134,4, 134,3, 132,2, 131,5, 130,4, 130,1, 130,0, 129,9, 128,7, 128,4, 128,3, 127,9, 127,8, 127,7, 127,6, 127,1, 126,8, 126,7, 126,6, 126,5, 123,6, 123,4, 122,6, 122,5, 121,8, 121,2, 120,6, 120,2, 119,6, 118,9 ppm. **UV-Vis (DMF):** $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 417 (5,49), 513 (4,19), 546 (3,69), 588 (3,63), 644 (3,49) nm. **MS (MALDI):** m/z 748,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-[3-Oxo-3-(piridin-4-il)propanil]-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 33g.

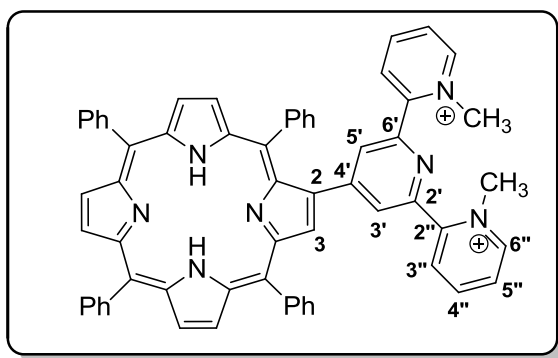


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8,85 (7H, m, H- β , H-2'' e H-6''), 8,62 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H- β), 8,57 (1H, s, H-3), 8,22 (8H, m, H-*o*-Ph), 7,80-7,62 (14H, m, H-*m,p*-Ph, H-3'' e H-5''), 3,45-3,34 (4H, m, H-1' e H-2'), -2,77 (2H, s, NH) ppm. **UV-Vis (DMF):** $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 417 (5,28), 513 (3,94), 547 (3,25), 586 (3,14), 646 (2,66) nm. **MS (MALDI):** m/z 748,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.5.2.5. Síntese dos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo, 34e-g

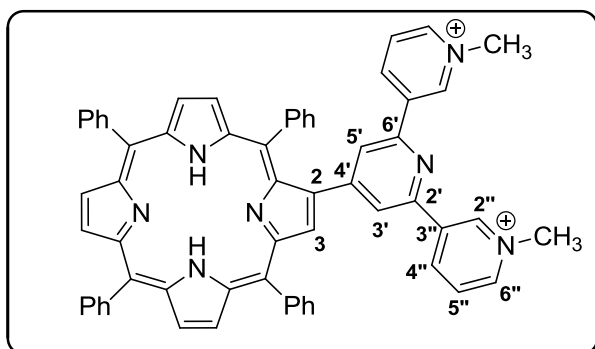
Num tubo selado adicionou-se o respetivo derivado do tipo porfirina-piridina **30** (10 mg, 11,8 μ mol), DMF seco (1 mL) e iodeto de metilo em excesso (100 μ L, \approx 60 equivalentes). A mistura reacional foi mantida sob agitação a 40 °C, durante aproximadamente 120 horas. De seguida, colocou-se a mistura reacional num recipiente com gelo e após o seu arrefecimento adicionou-se éter dietílico até se verificar a formação de um precipitado. Filtrou-se o precipitado num funil com algodão e lavou-se com éter dietílico. Os cristais retidos no algodão foram dissolvidos com uma solução de diclorometano/metanol (9:1) e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os resíduos foram então dissolvidos em diclorometano e precipitados em hexano. Por fim, adicionou-se dietilamina ao filtrado, de forma a destruir todo o iodeto de metilo que possa não ter reagido. Os derivados **34e**, **34f** e **34g** foram obtidas com rendimentos de 70%, 76% e 74%, respetivamente.

Di-iodeto de 2-(2',6'-bis-(2-piridil)-piridin-4-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 34e.



RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 e MeOH D_4): δ 9,33 (2H, d, $J = 5,9$ Hz, H-6''), 9,04 (1H, s, H-3), 8,89 (2H, AB, $J = 4,9$ Hz, H- β), 8,82 (1H, d, $J = 4,9$ Hz, H- β), 8,79 e 8,77 (2H, AB, $J = 4,9$ Hz, H- β), 8,75 (1H, d, $J = 4,9$ Hz, H- β), 8,65-8,60 (2H, m, H-4''), 8,26-8,24 (4H, m, H-*o*-Ph e H-3''), 8,21-8,18 (6H, m, H-*o*-Ph e H-5''), 8,12 (2H, s, H-3' e H-5'), 7,78-7,71 (9H, m, H-*m,p*-Ph), 7,49-7,78 (2H, m, H-*o*-Ph), 7,31-7,28 (3H, m, H-*m,p*-Ph), 4,57 (6H, s, CH_3) ppm. **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 e MeOH D_4):** δ 152,7 (C-2' e C-6'), 151,1 (C-2''), 148,5, 148,3 (C-6''), 146,2 (C-4''), 141,6, 141,5, 141,3, 137,1 (C-5''), 134,9, 134,8, 134,7, 131,8, 130,6 (C-3''), 129,9, 129,3, 129,0, 128,9, 128,6, 128,3, 128,1, 127,2, 127,1, 127,0, 121,4, 120,9, 119,7, 50,2 (CH_3) ppm. **UV-Vis (DMF):** $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 422 (4,95), 518 (3,48), 553 (3,37), 595 (3,31), 653 (3,19) nm. **MS (MALDI):** m/z 874 $[\text{M-H}]^+$ e m/z 860 $[\text{M-CH}_3]^+$.

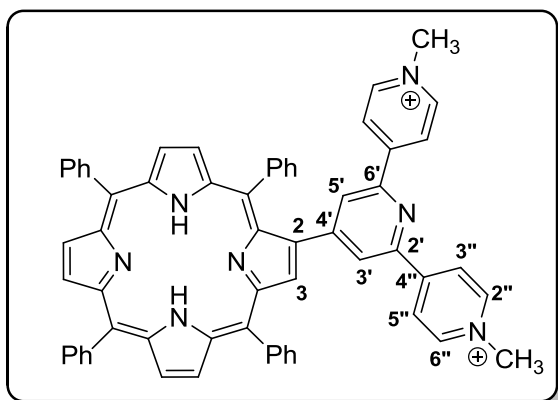
Di-iodeto de 2-(2',6'-bis-(3-piridil)-piridin-4-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 34f.



RMN de ^1H (300 MHz, DMSO): δ 9,88 (2H, s, H-2''), 9,46 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, H-6''), 9,13 (2H, d, $J = 6,0$ Hz, H-4''), 8,94-8,74 (7H, m, H- β), 8,41 (2H, s, H-3' e H-5'), 8,36-8,02 (10H, m, H-5'' e H-*o*-Ph), 7,87-7,79 (9H, m, H-*m,p*-Ph), 7,17-7,03

(3H, m, H-*m,p*-Ph), 4,52 (6H, s, CH_3), -2,75 (2H, s, NH) ppm. **UV-Vis** (DMF): $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 423 (4,89), 518 (3,50), 554 (3,40), 597 (3,22), 649 (3,07) nm. **MS** (MALDI): m/z 874 $[\text{M}-\text{H}]^+$ e m/z 860 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$.

Di-iodeto de 2-(2',6'-bis-(4-piridil)-piridin-4-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirina, 34g.



RMN de ^1H (300 MHz, DMSO): δ 9,15 (4H, d, $J = 6,8$ Hz, H-2'' e H-6''), 9,00 (4H, d, $J = 6,8$ Hz, H-3'' e H-5''), 8,95-8,79 (7H, m, H- β), 8,65 (2H, s, H-3' e H-5'), 8,30-8,05 (8H, m, H-*o*-Ph), 7,87-7,79 (9H, m, H-*m,p*-Ph), 7,10-7,00 (3H, m, H-*m,p*-Ph), 4,44 (6H, s, CH_3), -2,75 (2H, s, NH) ppm. **UV-Vis** (DMF): $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 423 (4,89), 518 (3,50),

554 (3,40), 597 (3,22), 649 (3,07) nm. **MS** (MALDI): m/z 874 $[\text{M}-\text{H}]^+$ e m/z 860 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$.



CAPÍTULO 3

***– Estudos da atividade biológica de novos derivados catiónicos β -
funcionalizados com grupos piridilo –***

3. Estudos da atividade biológica de novos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo

3.1. *Preâmbulo*

Como já foi referido anteriormente, as porfirinas e seus análogos têm atraído a atenção de muitos grupos de investigação devido às suas potenciais aplicações em terapia fotodinâmica e na fotoinativação de microrganismos. Para o processo fotodinâmico ocorrer é necessário a combinação de um fotossensibilizador, oxigénio e luz, para que seja possível produzir espécies citotóxicas como o oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$) e outras espécies reativas de oxigénio. A eficácia destas terapias depende não só da eficiência de gerar $^1\text{O}_2$ por parte fotossensibilizador, mas também da disponibilidade de fontes de luz e ainda da capacidade de acumulação do fotossensibilizador nas células.

Nos últimos anos, vários grupos de investigação têm utilizado novos métodos para a modificação de macrociclos porfirínicos com o objetivo de obter compostos com propriedades fotofísicas e fotoquímicas adequadas para serem utilizados como fotossensibilizadores em PDI. Este capítulo teve como principal objetivo o estudo da capacidade dos derivados do tipo porfirina-piridina catiónicos **34** (**Figura 35**) atuarem como fotossensibilizadores em PDI.

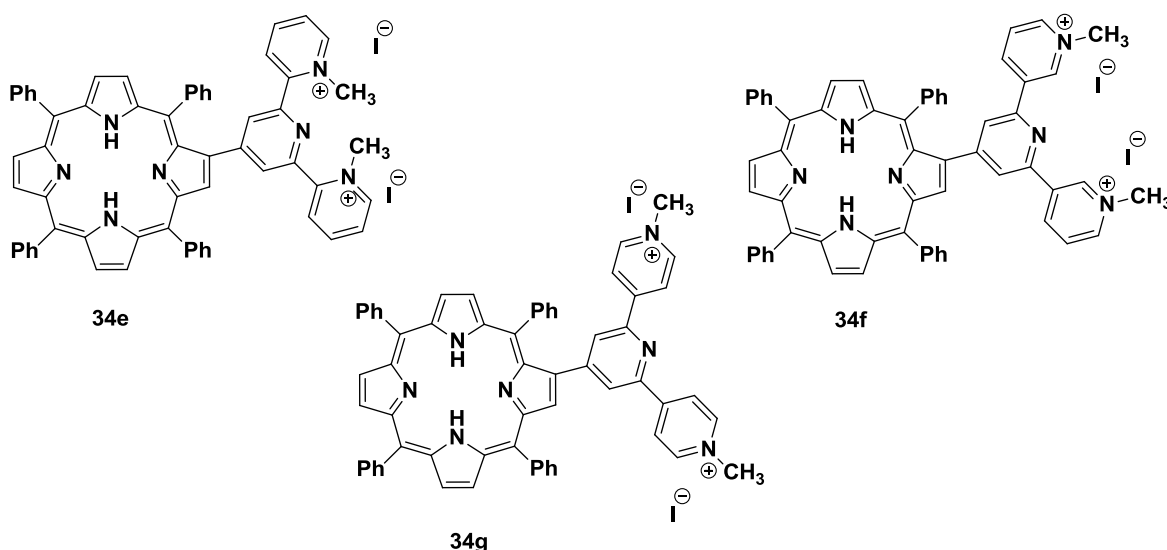
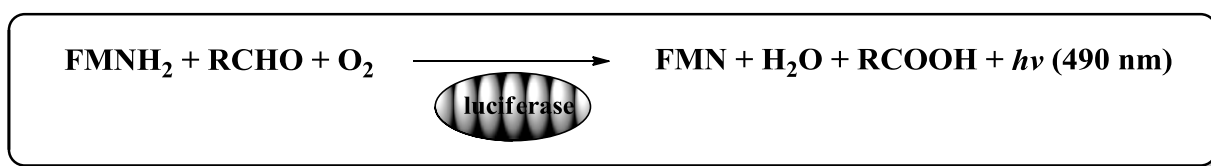


Figura 35. Estrutura dos derivados catiónicos **34** preparados e estudados neste trabalho como fotossensibilizadores em PDI.

3.2. Avaliação da atividade fotodinâmica dos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo em *Escherichia Coli* bioluminescente

A bioluminescência consiste num processo de emissão de luz visível por organismos vivos, catalisado por uma enzima.⁶⁸ Neste processo a produção de luz é diretamente dependente da atividade metabólica do organismo e portanto, a inibição da atividade celular resulta na diminuição da taxa de respiração e consequentemente no decréscimo da taxa de bioluminescência.^{69,70}

As enzimas que catalisam a reação de bioluminescência nas bactérias são denominadas de luciferases e os substratos são referidos como luciferinas.^{69,71,72,73} A luciferase bacteriana é uma enzima heterodimérica de 77 kDa, constituída por duas subunidades distintas, subunidade α (40 kDa) e subunidade β (37 kDa), codificadas pelos genes *luxA* e *luxB*, respetivamente.^{70,72} A reação catalisada por esta enzima envolve a oxidação do mononucleotídeo de flavina reduzido (FMNH₂) e de um aldeído de cadeia longa, que resulta na emissão de luz azul-verde, $\lambda \approx 490$ nm (**Esquema 24**).^{69,70,72,73}



Esquema 24.

Nas bactérias bioluminescentes existe um operão que contém cinco genes (*luxCDABE*) que codificam a luciferase e as enzimas biossintéticas necessárias para a síntese do substrato aldeído, que é necessário para a produção de luz.^{70,71} Os genes *luxA* e *luxB*, como já mencionado anteriormente, codificam as subunidades α e β da luciferase, enquanto os genes *luxC*, *luxD* e *luxE* codificam as proteínas para a produção do aldeído.^{70,71,73} No entanto, apesar de um número adicional de genes *lux* em bactérias bioluminescentes ter sido identificado, apenas o operão *luxCDABE* é essencial para a produção de luz.^{70,74}

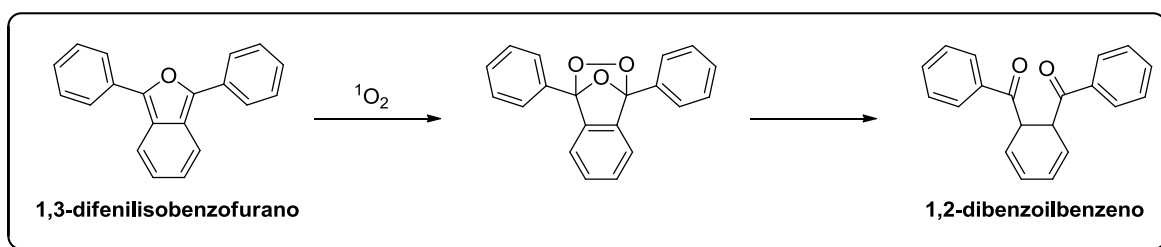
O isolamento do operão *lux*, responsável pelo processo de bioluminescência nas bactérias, e a capacidade de transferir este operão para organismos procariotas e eucariotas,

contribuiu para a possibilidade de deteção da atividade antimicrobiana em tempo real.^{68,69,71}

3.2.1. Estudos de geração de oxigénio singlete dos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo

De acordo com a literatura, a atividade fotodinâmica de um fotossensibilizador está fortemente relacionada com a produção de oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$) e portanto é fundamental a determinação da eficiência desse fotossensibilizador em gerar $^1\text{O}_2$.

A capacidade dos derivados do tipo porfirina-piridina catiónicos **34** em gerar $^1\text{O}_2$ foi qualitativamente avaliada através da monitorização da fotodecomposição do 1,3-difenilisobenzofurano (DFiBF). O DFiBF é um composto que absorve radiação visível e apresenta um máximo de absorção a 415 nm, sendo utilizado para a determinação relativa de produção de $^1\text{O}_2$, uma vez que na presença de $^1\text{O}_2$ sofre facilmente reações de cicloadição [4 + 2] convertendo-se em 1,2-dibenzoilbenzeno (**Esquema 25**).



Esquema 25.

Esta reação pode servir de base para a determinação qualitativa da produção de $^1\text{O}_2$, uma vez que o 1,2-dibenzoilbenzeno formado não absorve na região do visível, o que provoca um decréscimo da absorvência da solução com o fotossensibilizador e o DFiBF. Este decréscimo permite a avaliação qualitativa da formação de $^1\text{O}_2$ produzida pelo fotossensibilizador presente na solução.

É ainda importante referir, que o DFiBF e o fotossensibilizador são colocados num solvente que permita a dissolução de ambos e que seja o mais próximo possível com o ambiente em que o PS será avaliado biologicamente. No que diz respeito à concentração do DFiBF, esta deve ser aproximadamente 100 vezes superior à do fotossensibilizador,

uma vez que os derivados porfirínicos também possuem a banda *Soret* bastante intensa, sendo necessário minimizar o efeito desta banda na determinação de absorvência a 415 nm. Neste caso em particular, o solvente utilizado era constituído por uma mistura de DMF/H₂O na proporção de 9:1, as medições espectrofotométricas da absorvência foram realizadas a 415 nm, com o DFiBF numa concentração de 50 µM e o PS numa concentração de 0,5 µM e as cuvets de UV-Vis foram irradiadas com luz de comprimento de onda > 540 nm e com uma potência de 9,0 mW/cm².

Durante a irradiação as soluções foram mantidas sob agitação magnética. Se o fotossensibilizador conseguir produzir ¹O₂, após a irradiação da solução, observa-se um decréscimo na absorvência do DFiBF resultante do decréscimo da concentração deste.

Os resultados obtidos podem ser representados sob a forma de um gráfico onde se relaciona o logaritmo neperiano do quociente entre a absorvência inicial e a absorvência num dado momento, em função do tempo de radiação em minutos. Deste modo, é possível relacionar diretamente o decréscimo de absorvência de DFiBF a 415 nm com a capacidade do fotossensibilizador gerar ¹O₂ (**Figura 36**). Como fotossensibilizador de referência utilizou-se a 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina (**Tetra-Py⁺-Me**), que já foi caracterizada como sendo um bom gerador de oxigénio singlete e já provou ser eficaz na inativação fotodinâmica de microrganismos.⁷⁵

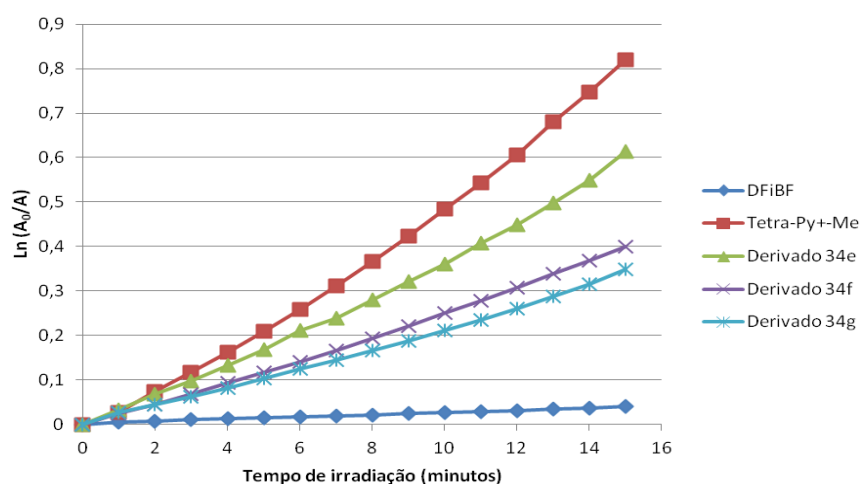


Figura 36. Fotodecomposição do DFiBF pelo ¹O₂ gerado pelos derivados dicatiónicos **34** e pela referência **Tetra-Py⁺-Me**.

Como é possível observar, todos os derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo **34** mostram ser capazes de gerar $^1\text{O}_2$, uma vez que se observa uma fotodegração significativa do DFiBF. Os compostos sintetizados mostram ter uma capacidade de produção de $^1\text{O}_2$, mas não superior à da **Tetra-Py⁺-Me** e portanto é possível concluir que os compostos preparados apresentam um grande potencial para serem utilizados como fotossensibilizadores em PDI.

3.2.2. Estudos de fotoinativação da bactéria *E. Coli* na presença dos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo

Para os estudos de avaliação da capacidade de fotoinativação bacteriana na presença dos derivados catiónicos β -funcionalizados, utilizou-se uma bactéria que permite avaliar em tempo real a capacidade fotoinativadora dos fotossensibilizadores preparados. Como já foi referido anteriormente, este método baseia-se na emissão de luz visível por organismos vivos que está diretamente relacionada com a atividade metabólica da bactéria. Portanto, uma diminuição da atividade metabólica conduz ao decréscimo da emissão de luz e é essa variação de emissão de luz visível pela bactéria bioluminescente que é quantificada.

Neste trabalho utilizou-se a *E. Coli*, em que as células foram transformadas com genes do operão *luxCDABE*, provenientes das bactérias bioluminescente *Vibrio fischeri*, de modo a conferir bioluminescência à bactéria. Deste modo, foi possível monitorizar a viabilidade das células bacterianas na presença do fotossensibilizador, através do decréscimo da intensidade da luz visível.

Para os estudos de fotoinativação foram preparadas as soluções *stock* em DMSO dos derivados **34** com uma concentração de 500 μM . A estirpe bioluminescente de *E. Coli* transformada foi diluída 10 vezes em tampão fosfato salino (PBS) e um determinado volume de fotossensibilizador a partir da solução *stock* foi adicionado, de modo a atingir uma determinada concentração final. Após um período de incubação no escuro de 15 minutos, as suspensões bacterianas foram expostas a luz branca (380-700 nm) em agitação constante e com uma potência de 4,0 mW.cm^{-2} , durante 270 minutos a uma temperatura de aproximadamente 25 °C. Alíquotas de cada amostra foram recolhidas a partir do instante 0

e de 30 em 30 minutos até atingir os 270 minutos. A bioluminescência dessas alíquotas foi medida num luminómetro (TD-20/20 Luminometer, Tumor Designs, Inc., USA). Foram ainda preparados, um controlo escuro para todos os fotossensibilizadores em estudo e um controlo claro (CC) ao qual não foi adicionado fotossensibilizador, sendo este apenas sujeito às mesmas condições de irradiação. No que se refere ao controlo escuro (CE), foi adicionado fotossensibilizador, de modo a atingir a concentração pretendida, e de seguida, foi protegido da luz com papel de alumínio e mantido nas restantes condições experimentais. Todas as experiências foram feitas em triplicado e pelo menos em duas experiências independentes.

Começou-se por testar a fotoinativação da bactéria *E. Coli* em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 40 μM) do derivado **34f** com a finalidade de compreender se a concentração afetava significativamente a fotoinativação. Os resultados obtidos foram tratados graficamente e apresentada a atividade bioluminescente da bactéria em função do tempo de irradiação (**Figura 37**). Estes resultados permitiram observar que a concentrações mais baixas (5 μM e 10 μM) a diminuição da capacidade de emitir luz pela bactéria *E. Coli* bioluminescente foi de aproximadamente 1 log ao fim de 270 minutos de exposição à luz. Para as concentrações mais elevadas, de 20 μM e 40 μM , verificou-se que ao fim de 120 minutos houve um maior decréscimo da bioluminescência para a concentração de 40 μM . No entanto, ao fim dos 270 minutos verificou-se uma diminuição da capacidade de emissão de bioluminescência semelhante para estas duas concentrações, de aproximadamente 2 log.

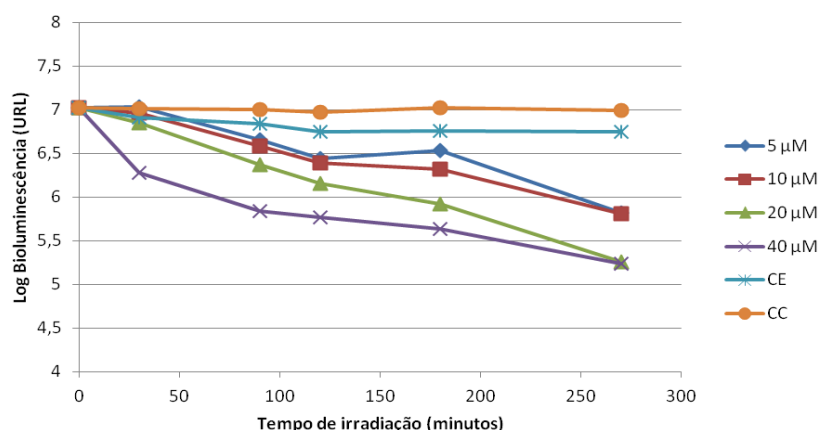


Figura 37. Monitorização da bioluminescência do derivado catiónico **34f** a diferentes concentrações: a suspensão bacteriana foi exposta a luz branca com uma potência de $4,0 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Com base nos resultados acima descritos, decidiu-se testar a eficácia da fotoinativação dos três derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo a uma concentração de 20 μM . Sabe-se que quanto maior for o decréscimo da bioluminescência, maior será a eficácia na inativação fotodinâmica provocada pelos fotossensibilizadores. Tal como nos testes de oxigénio singlete, a **Tetra-Py⁺-Me** foi utilizada como fotossensibilizador de referência, uma vez que já demonstrou elevada eficácia na inativação fotodinâmica da *E. Coli*.⁷⁵

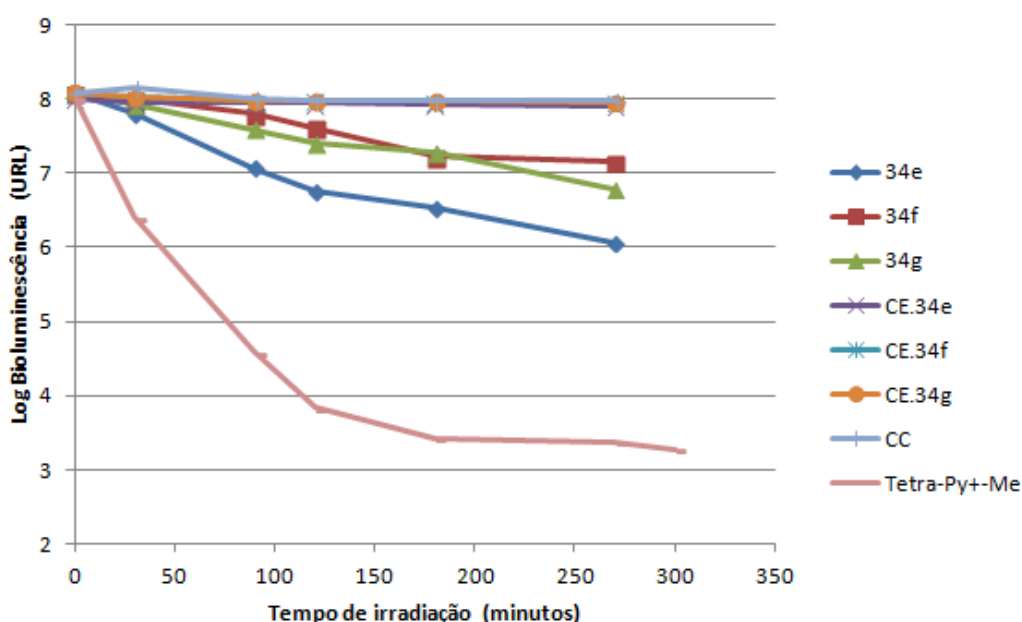


Figura 38. Monitorização da bioluminescência dos derivados catiónicos **34** a uma concentração de 20 μM : a suspensão bacteriana foi exposta a luz branca com uma potência de 4,0 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Através da análise dos resultados obtidos foi possível concluir que os derivados porfirínicos catiónicos **34** podem atuar como fotossensibilizadores para PDI. O derivado **34e** foi o que demonstrou ser mais eficaz uma vez que se verificou uma maior diminuição da capacidade de emissão de bioluminescência por parte da bactéria em estudo, de aproximadamente 3 log ao fim de 270 minutos. Com estes resultados é possível concluir que a eficiência de inativação pode estar relacionada com a posição do nitrogénio do anel piridina, tal como já se verificou em estudos anteriores reportados na literatura.⁶⁷ Relativamente ao controlo claro e aos controlos escuros preparados, verificou-se que os níveis de bioluminescência mantiveram-se constantes ao longo do ensaio, sendo possível

concluir que a bactéria não é afetada pela luz nem pelos fotossensibilizadores na ausência da mesma. Portanto, é possível afirmar que o decréscimo da bioluminescência está apenas relacionada com a ação combinada do fotossensibilizador, oxigénio singlete e luz.

Uma vez que o derivado **34e** demonstrou ser o mais eficaz na fotoinativação da *E. Coli* decidiu-se repetir os estudos de fotoinativação, mas usando uma lâmpada com uma fibra ótica acoplada e emitindo luz branca com uma potência de 150 mW.m^{-2} (**Figura 39**). Os resultados mostram que, ao fim de 180 minutos de exposição à luz, este derivado foi capaz de inativar a bactéria *E. Coli* até ao limite de deteção do luminómetro.

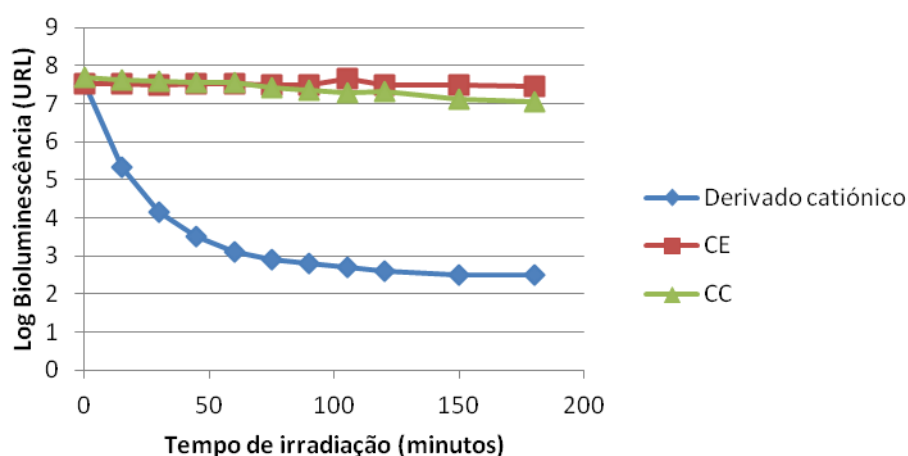


Figura 39. Monitorização da bioluminescência do derivado catiónico **34e** a uma concentração de $20 \mu\text{M}$: a suspensão bacteriana foi exposta a luz branca com uma potência de 150 mW.cm^{-2} .

3.3. Conclusão

Neste capítulo foi avaliada a capacidade de produção de $^1\text{O}_2$ pelos fotossensibilizadores. Os resultados obtidos mostram que estes derivados são eficientes em gerar esta espécie citotóxica e que o derivado **34e** foi o que demonstrou ser o mais eficaz.

Foram ainda descritos os resultados obtidos nos estudos da avaliação da atividade antibacteriana dos novos derivados catiónicos **34** β -funcionalizados com grupos piridilo. Os resultados obtidos mostram que estes derivados têm capacidade para fotoinativar a bactéria *E. Coli* e a posição da carga no anel piridina afeta a sua eficiência de fotoinativação. Mais uma vez, o derivado **34e** foi o que demonstrou ser mais eficaz.

3.4. Seção experimental

3.4.1. Anotações gerais

A descrição dos reagentes, solventes, material e aparelhos utilizados na síntese e caracterização dos compostos descritos neste capítulo já foram referidos no capítulo 2.

A bioluminescência da bactéria *E. Coli* foi medida num luminómetro (TD-20/20 Luminometer, Tumer Designs, Inc., USA).

3.4.2. Procedimento geral

3.4.2.1. *Determinação da produção de oxigénio singleto dos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo*

As soluções stock dos derivados porfirina-piridina catiónicos **34e-g** a 0,1 mM e do difenilisobenzofurano (DFiBF) a 10 mM foram preparadas em DMF. Em células de vidro foram preparadas 2,5 mL de solução contendo 50 μ M de DFiBF e 0,5 μ M de cada derivado porfirina-piridina catiónico em DMF/H₂O na proporção de 9:1. As cuvetes de UV-Vis foram irradiadas com luz branca passada por filtro que não deixa passar abaixo de 540 nm e com uma potência de 9,0 mW/cm². Durante a irradiação, as soluções permaneceram em agitação magnética à temperatura ambiente. A absorvência foi medida a 415 nm a cada 1 minuto durante 15 minutos. A percentagem de redução deste valor é proporcional à produção de ¹O₂ pelo fotossensibilizador e foi calculada por comparação entre a absorvência inicial da solução e a absorvência registada ao fim de cada minuto de irradiação. Os resultados obtidos foram comparados com uma solução de **Tetra-Py⁺-Me** em DMF, preparada do mesmo modo que os derivados porfirina-piridina catiónicos e sujeita às mesmas condições de irradiação.

3.4.2.2. *Estudos de fotoinativação dos derivados catiónicos β -funcionalizados com grupos piridilo*

A bactéria bioluminescente de *E. Coli* foi cultivada em Agar Triptona de Soja (TSA), suplementado com ampicilina (50 mg.mL^{-1}) e cloranfenicol (34 mg.mL^{-1}) e armazenada a -80°C em 10% de glicerol. Antes de cada ensaio, uma colónia de bactéria bioluminescente foi inoculada em 30 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB), suplementada com os dois antibióticos (ampicilina, $15 \mu\text{L}$ e cloranfenicol, $18 \mu\text{L}$) e mantida durante 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, preparou-se uma diluição da cultura anterior (1:10), em PBS. Preparou-se quatro soluções *stock* com uma concentração de $500 \mu\text{M}$ dos fotossensibilizadores **34e**, **34f**, **34g** e **Tetra-Py⁺-Me** em DMSO. Em copos de vidro esterilizados preparou-se o controlo claro (15 mL da suspensão bacteriana), as amostras e os respetivos controlos escuros (14,4 mL da suspensão bacteriana e $600 \mu\text{L}$ do fotossensibilizador). Os copos foram incubados no escuro durante 15 minutos e findo esse tempo, as suspensões bacterianas foram expostas a luz branca exceto os controlos escuros. De 30 em 30 minutos, foram retiradas alíquotas ($500 \mu\text{L}$) de cada copo para um eppendorf, durante 270 minutos de ensaio. Estes procedimentos foram todos realizados em condições de assepsia. A bioluminescência das alíquotas retiradas foi medida num luminómetro.

CAPÍTULO 4

– *Bibliografía* –

4. Bibliografia

- ¹ Buchler, J. W. “*Porphyrins and Metalloporphyrins*”, Eds.: Smith, K. M., Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1975**, Capítulo 5, pág. 157.
- ² Milgrom, L. R. “*The colours of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*”; Oxford University Press, Oxford: Inglaterra, **2000**; pág. 1.
- ³ Moura, N. M. M. “*Síntese e potenciais aplicações de novas porfirinas β -funcionalizadas*” Tese de Doutoramento da Universidade de Aveiro, **2012**.
- ⁴ Lacerda, P. S. S. “*Síntese de novos macrociclos tetrapirrólicos*,” Tese de Doutoramento da Universidade de Aveiro, **2007**.
- ⁵ Rothmund, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 58, 625.
- ⁶ Rothmund, P.; Menotti, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63, 267.
- ⁷ Adler, A. D.; Longo, F. R.; Shergalis, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 3145.
- ⁸ Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmecher J.; Assour, J.; Korsakoff, L. *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 476.
- ⁹ G. H. Barnett, M. F. Hudson, K. M. Smith, *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1975**, 1401.
- ¹⁰ Lindsey, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 827.
- ¹¹ Gonsalves, A. M. D. R.; Pereira, M.M. *J. Heterocycl. Chem.* **1985**, 22, 931.
- ¹² Gonsalves, A. M. R.; Varejão, J. M. T. B.; Pereira, M. M. *J. Heterocycl. Chem.* **1991**, 28, 635.
- ¹³ Paula, R.; Faustino, M. A. F.; Pinto, D. C. G. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. *S. J. Heterocycl. Chem.* **2008**, 45, 453.
- ¹⁴ Givianrad, M. H.; Bahrami, A. *Asian J. Chem.* **2013**, 25, 6102.
- ¹⁵ Jaquinod, L. “*The Porphyrin Handbook*”, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R. Eds.; Academic Press: Nova Iorque, **2000**, Vol. 5, pág. 202.

- ¹⁶ Serra, V. I. R. C. V. “*Síntese e potencialidades de aplicação de novos derivados porfirínicos*” Tese de Doutoramento da Universidade de Aveiro, **2011**.
- ¹⁷ Vicente, M. G. In “*The Porphyrin Handbook - Synthesis and Organic Chemistry*”; Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Ed.; Academic Press, **2000**; vol.1, pág. 150.
- ¹⁸ Vilsmeier, A.; Haack, A. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1927**, *60*, 119.
- ¹⁹ El-Shishtawy, R. M.; Almeida, P. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *62*, 7793.
- ²⁰ Inhoffen, H. H.; Fuhrhop, J. H.; Voigt, H.; Brockmann, H. Jr. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1996**, *695*, 133.
- ²¹ (a) Balakumar, A.; Mutukumaran, K.; Lindsey, J. S. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5112. (b) Ponomarev, G. V.; Yashunskii, D. V.; Moskovkin, A. S. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1997**, *33*, 271.
- ²² Bonfantini, E. E.; Burrell, A. K.; Campbell, W. M.; Crossley, M. J.; Gosper, J. J.; Harding, M. M.; Officer, D. L.; Reid, D. C. W. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2002**, *6*, 708.
- ²³ Yaseen, M.; Ali, M.; NajeebUllah, M.; Ali Munawar, M.; Khokhara, I. *J. Heterocyclic. Chem.* **2009**, *46*, 251.
- ²⁴ Moura, N. M. M.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Duarte, A. C.; Cavaleiro, J. A. S. *Porphyrins Phthalocyanines* **2011**, *15*, 652.
- ²⁵ Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Vicente, M. G. H.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3569.
- ²⁶ Moura, N. M. M.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Paz, F. A. A.; Silva, A. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6142.
- ²⁷ Silva, A. M. G.; Lacerda, P. S. S.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Marakova, E. A.; Lukyanets, E. A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8352.
- ²⁸ Peixoto, A.; Pereira, M. M.; Neves, M. G. P. M. S.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5593.

- ²⁹ Silva, A. M. G.; Faustino, M. A. F.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 1, 2752.
- ³⁰ (a) Ishkov, Y. V.; Zhilina, Z. I.; Barday, L. P. *Porphyrins Phthalocyanines* **2003**, 07, 761. (b) Liu, X.-G.; Feng, Y.-Q.; Tan, C.-J.; Chen, H.-L. *Synth. Commun.* **2006**, 36, 2655. (c) Reeta, P. S.; Kandhadi, J.; Lingamallu, G. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 2865. (d) Senge, M. O.; Roßler, B.; Gersdorff, J. v.; Schafer, A.; Kurreck, H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3363. (e) Stephenson, A. W. I.; Wagner, P.; Partridge, A. C.; Jolley, K. W.; Filichev, V. V.; Officer, D. L. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5632. (f) Giribabu, L.; Reeta, P. S.; Kanaparthi, R. K.; Srikanth, M.; Soujanya, Y. *J. Phys. Chem. A* **2013**, 117, 2944.
- ³¹ Malinen, P. K.; Tauber, A. Y.; Hynnenen, P. H.; Montforts, F.-P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3381.
- ³² Tamiaki, H.; Kouraba, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 53, 10677.
- ³³ Silva, E. M. P.; Ramos, C. I. V.; Pereira, P. M. R.; Giuntini, F.; Faustino, M. A. F.; Tomé, J. P. C.; Tomé, A. C.; Silva, A. M. S.; Santana-Marques, M. G.; Neves, M. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2012**, 16, 101.
- ³⁴ Silva, A. M. G.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 726.
- ³⁵ Vail, S. A.; Schuster, D. I.; Guldi, D. M.; Isosomppi, M.; Tkachenko, N. .; Lemmetyinen, H.; Palkar, A.; Echegoyen, L.; Chen, X.; Zhang, J. Z. H. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 14155.
- ³⁶ Tagliatesta, P.; Lembo, A.; Leoni A.; *New J. Chem.*, **2013**, 37, 3416.
- ³⁷ Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *Arkivoc* **2005**, (ix), 332.
- ³⁸ Pereira, A. M. V. M.; Soares, A. R. M.; Hausmann, A. .; Silva, A. M. S.; Neves, M. G. P. M. S.; Tome, A. C.; Cavaleiro, A. S.; Guldi, D. M.; Torres, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 11858.
- ³⁹ Moura, N. M. M.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Rakib, E. M.; Hannioui, A.; Mojahidi, S.; Hackbarth, S.; Röder, B.; Almeida, F. A. P.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *Tetrahedron* **2012**, 68, 8181.

- ⁴⁰ Silva, A. M. G.; Oliveira, Kleber T.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Brandão, P.; Felix, V. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 704.
- ⁴¹ Sharma, S.; Nath, M. *J. Heterocycl. Chem.* **2012**, 49, 88.
- ⁴² Bastos, M. M.; Gomes, A. T. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Silva, A. M. S.; Santos-Filho, O. A.; Boechat, N.; Cavaleiro, J. A. S. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1485.
- ⁴³ MacDonald, I. J.; Dougherty, T. J. *J. Porphyrins Phtalocyanines* **2001**, 5, 105.
- ⁴⁴ Castro, K. A. D. F.; Simões, M. M. Q.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Wypych, F.; Nakagaki, S. *Catal. Sci. Technol.* **2014**, 4, 129.
- ⁴⁵ Linhares, M.; Rebelo, S. L. H.; Simões, M. M. Q.; Silva, A. M. S.; Neves, G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Freire, C. *Applied Catalysis A: General* **2014**, 470, 427.
- ⁴⁶ Han, Z. X.; Luo, H. B.; Zhang, X. B.; Kong, R. M.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Spectrochim. Acta Part A* **2009**, 72, 1084.
- ⁴⁷ Lee, C. W.; Lu, H. P.; Lan, C. M.; Huang, Y. L.; Liang, Y. R.; Yen, W. N.; Liu, Y. C.; Lin, Y. S.; Diau, E. W. G.; Yeh, C. Y. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 1403.
- ⁴⁸ (a) Carvalho, C. M. B.; Gomes, A. T. P. C.; Fernandes, S. C. D.; Prata, A. C. B.; Almeida, M. A.; Cunha, M. A.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Lin, Z.; Rainho, J. P.; Rocha, J. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2007**, 88, 112. (b) Gábor, F.; Szocs, K. *Radiat. Env. Biophys* **2001**, 40, 145. (c) Krouit, M.; Robert, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1651.
- ⁴⁹ Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C. and Golab, J. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61, 250.
- ⁵⁰ DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 351, 233.
- ⁵¹ Alves, E.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Cunha, A.; Tomé, J.; Almeida, A. *Future Med. Chem.*, **2014**, 6, 141.
- ⁵² Bonnett, R. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 19.

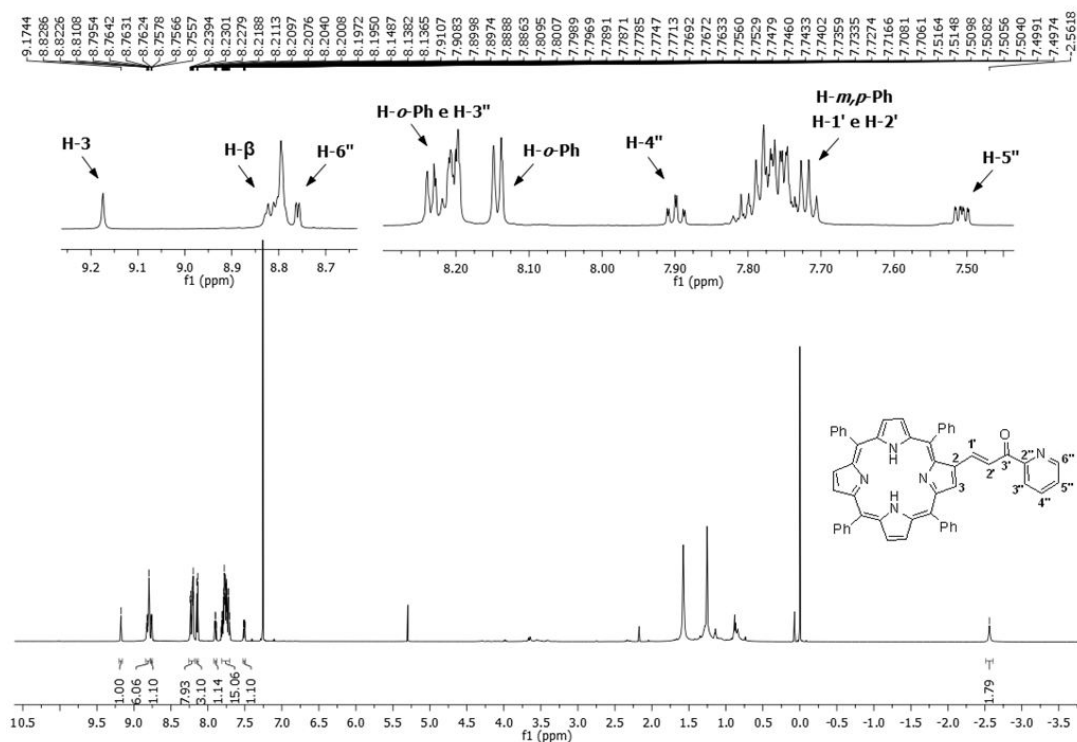
- ⁵³ Bonnett, R. “*Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*”, Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdão, **2000**.
- ⁵⁴ Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 279.
- ⁵⁵ Wainwright, M. J. *Antimicrob. Chemother.*, **1998**, *42*, 13.
- ⁵⁶ Malik, Z.; Hanania, J.; Nitzan, Y. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **1990**, *5*, 281.
- ⁵⁷ Jori, G.; Brown, S. B. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 403.
- ⁵⁸ Ochsner, M. J. *Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1997**, *39*, 1.
- ⁵⁹ Costa, L.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Cunha, A.; Almeida, A. *Viruses* **2012**, *4*, 1034.
- ⁶⁰ Malik, Z.; Ladan, H.; Nitzan, Y. *J. Photochem. Photobiol., B*, **1992**, *14*, 262.
- ⁶¹ Hamblin, M.; Hasan, T. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 436.
- ⁶² Caminos, D. A.; Spesia, M. B.; Pons, P.; Durantini, E. N. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, *7*, 1071.
- ⁶³ Pereira, M. A.; Faustino, M. A. F.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Almeida, A. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2014**, *13*, 680.
- ⁶⁴ Banfi, S.; Caruso, E.; Buccafurni, L.; Battini, V.; Zazzaron, S.; Barbieri, P.; Orlandi, V.; *J Photochem Photobiol B*, **2006**, *85*, 28.
- ⁶⁵ Caminos, D. A.; Spesia, M. B.; Durantini, E. N. *Photochem Photobiol Sci*, **2005**, *5*, 56.
- ⁶⁶ (a) Lazzeri, D.; Rovera, M.; Pascual, L.; Durantini, E. N. *Photochem Photobiol*, **2004**, *80*, 286. (b) Merchat, M.; Spikes, J. D.; Bertoloni, G.; Jori, G. *J Photochem Photobiol B*, **1996**, *5*, 149. (c) Merchat, M.; Bertolini, G.; Giacomini, P.; Villanueva, A.; Jori, G. *J Photochem Photobiol B*, **1996**, *32*, 153.
- ⁶⁷ Silva, E. M. P.; Giuntini, F.; Faustino, M. A. F.; Tomé, J. P. C.; Marques-Santana, M. G.; Correia-Ferrer, A. J.; Cavaleiro, J. A. S.; Cavaleiro, M. F.; Duarte, R. R.; Tavares, S. A. P.; Pegado, I. N.; Almeida, B.; Matos, A. P. A. D.; Valdeira, M. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3333.

- ⁶⁸ Meighen, E. A.; *FASEB Journal*, **1993**, 7, 1016.
- ⁶⁹ Vesterlund, S.; Paltta, J.; Laukova, A.; Karp, M.; *Journal of Microbiological Methods*, **2004**, 57, 23.
- ⁷⁰ Alves, E.; Carvalho, C. M. B.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Mendo, S.; Almeida, A.; *J Ind Microbiol Biotechnol*, **2008**, 35, 1447.
- ⁷¹ Alves, E.; Costa, L.; Cunha, Â.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Almeida, A.; *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2011**, 92, 1115.
- ⁷² Stewart, G. S. A. B.; Williams, P.; *J. Gener. Microbiol.* **1992**, 138, 1289.
- ⁷³ Meighen, E. A.; *Mol Biol Rev*, **1991**, 55, 123.
- ⁷⁴ Meighen, E. A.; *Ann Rev Genet*, **1994**, 28, 117.
- ⁷⁵ Foote, C. S.; *Photochem. Photobiol.* **1991**, 54, 659.

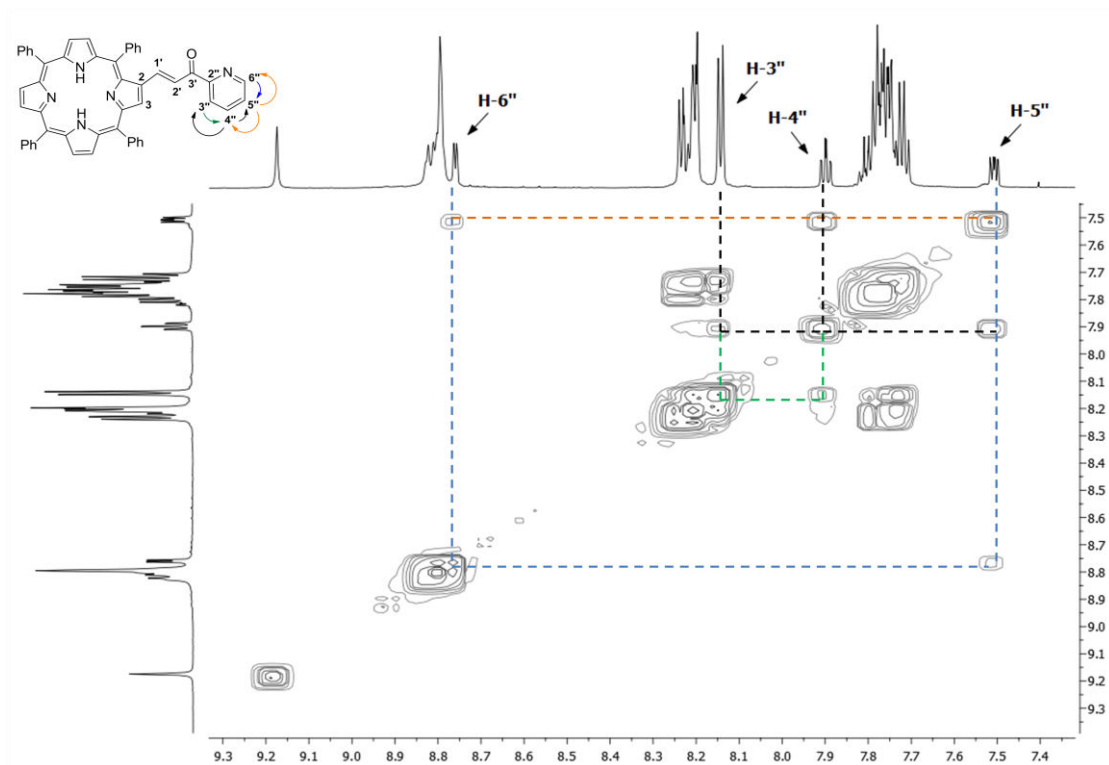
CAPÍTULO 5

– *Anexos* –

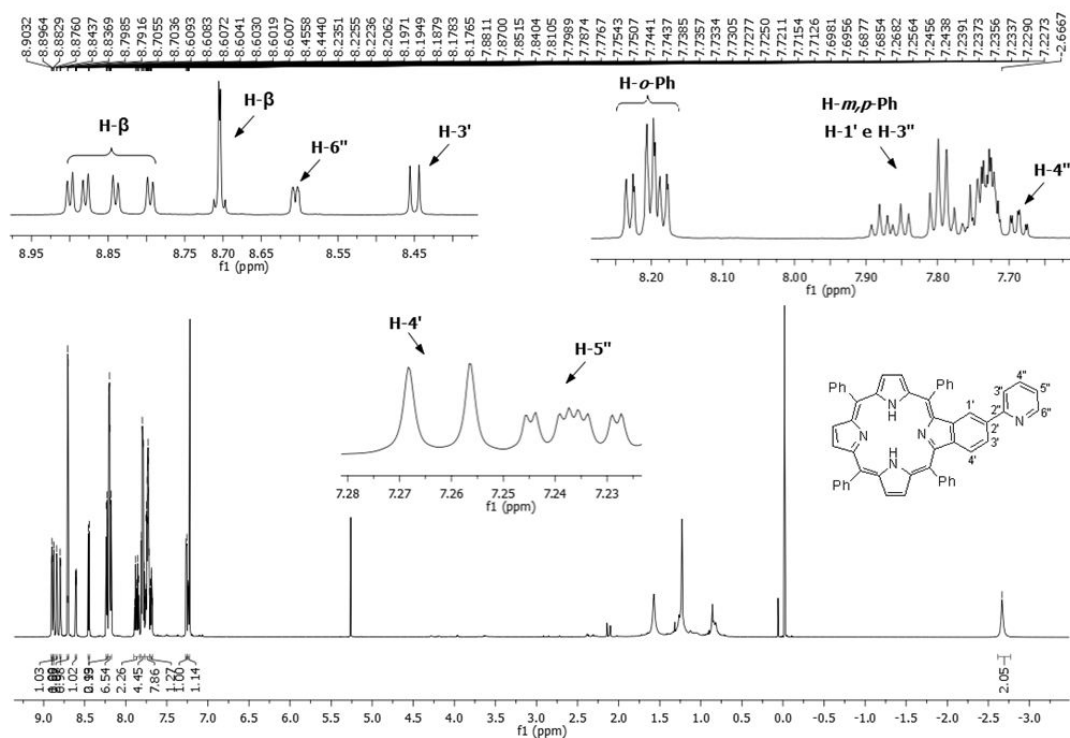
Anexo 1. Espetro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-calcona **28e** em CDCl_3 .



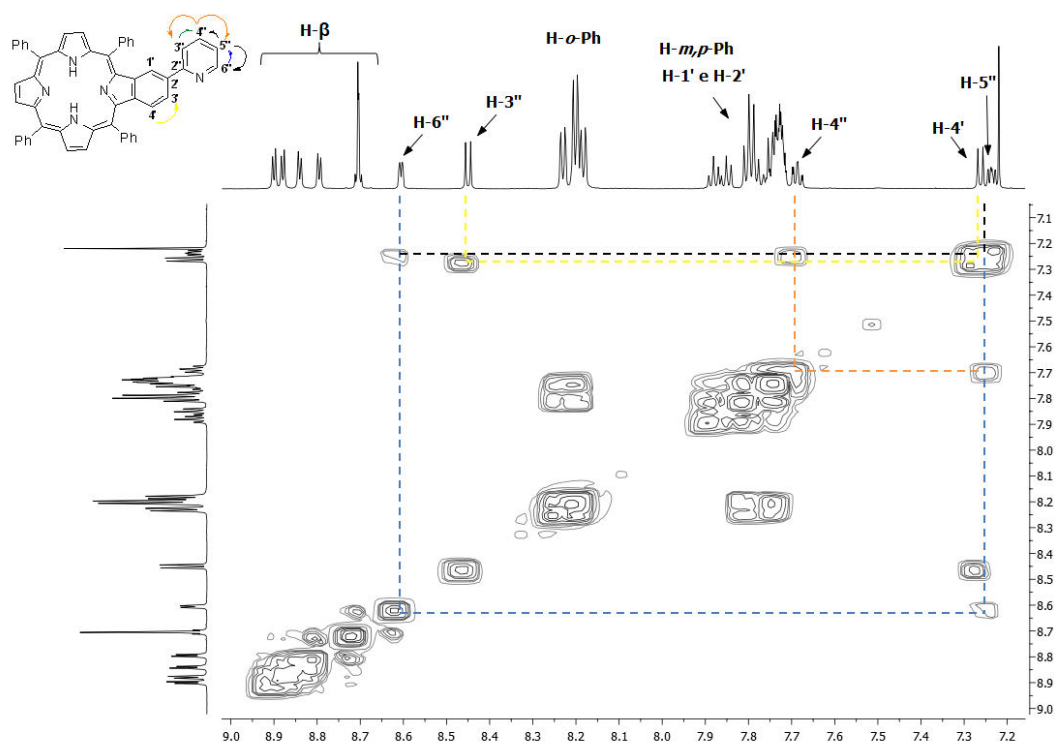
Anexo 2. Expansão do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do derivado do tipo porfirina-calcona **28e** em CDCl_3 .



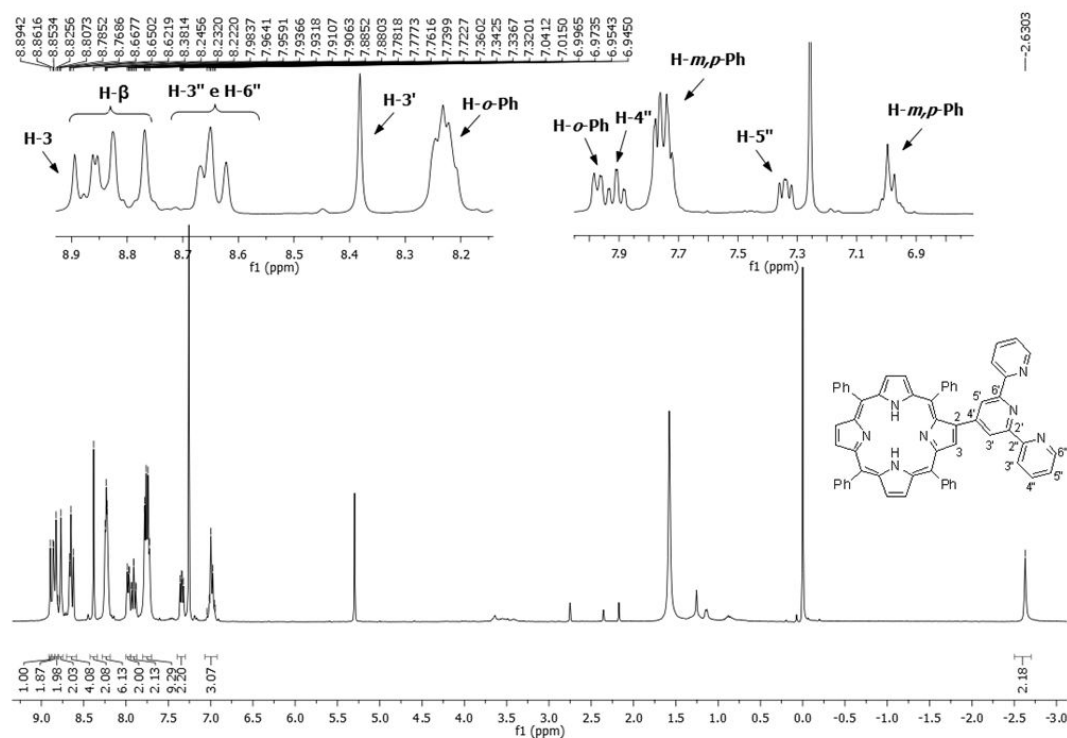
Anexo 3. Espectro de RMN de ^1H do derivado benzoporfirínico **29e** em CDCl_3 .



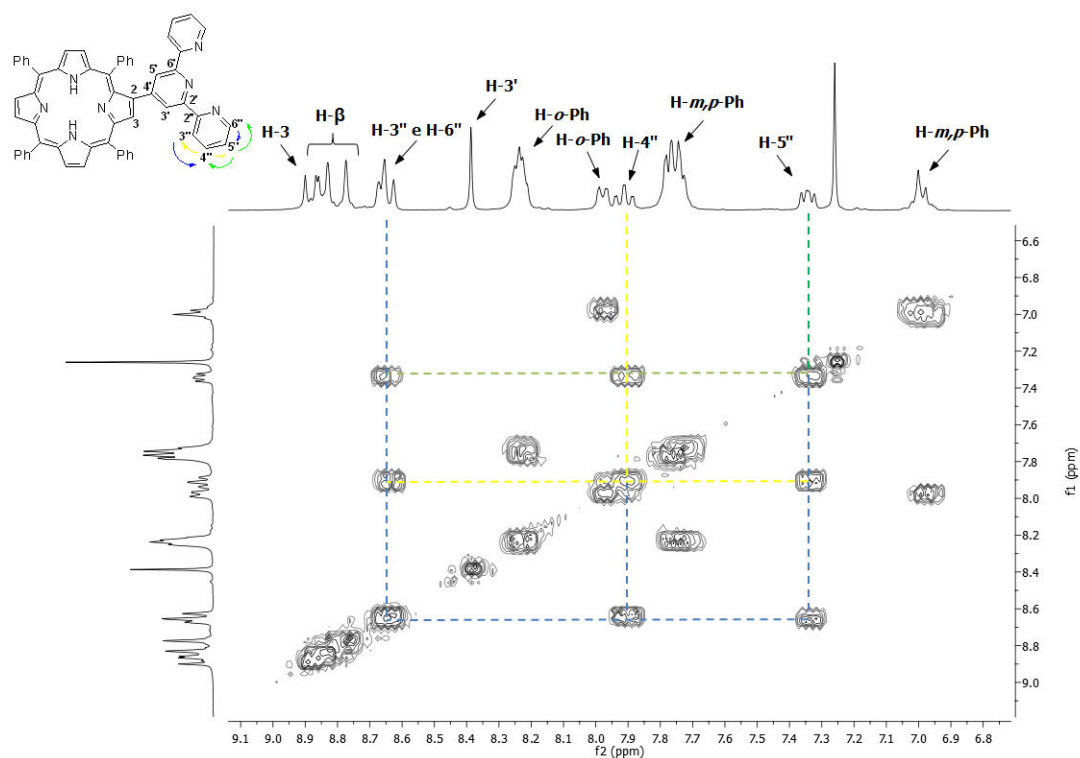
Anexo 4. Expansão do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do derivado benzoporfirínico **29e** em CDCl_3 .



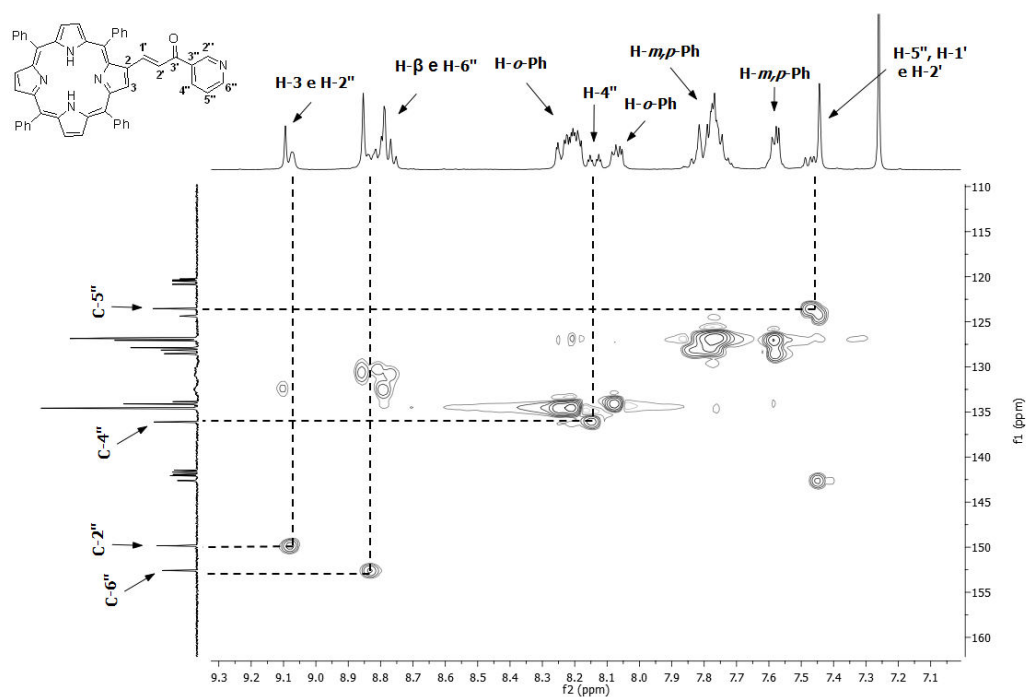
Anexo 5. Espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-piridina **30e** em CDCl_3 .



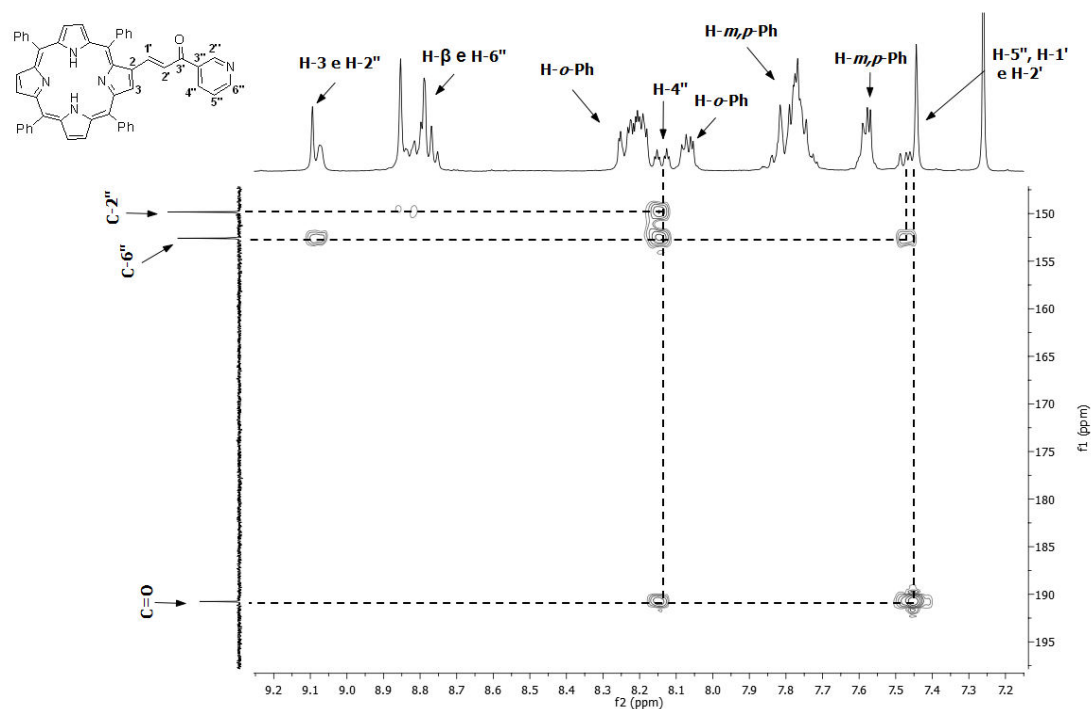
Anexo 6. Expansão do espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do derivado do tipo porfirina-piridina **30e** em CDCl_3 .

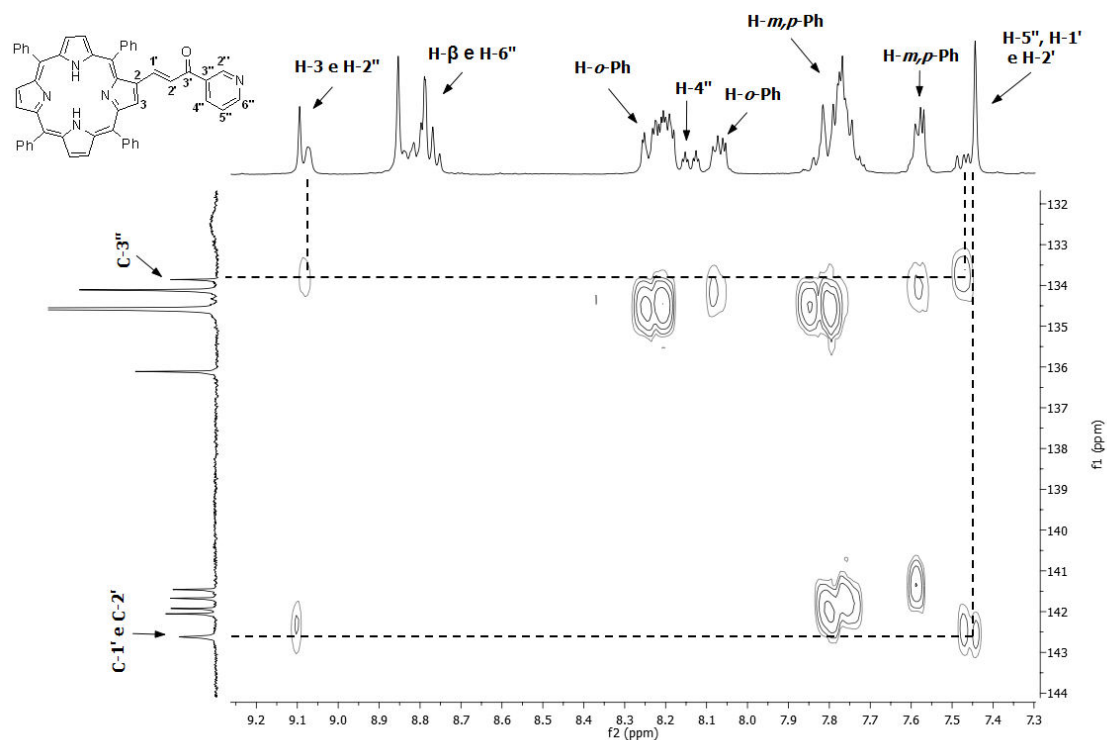


Anexo 7. Expansão do espectro de HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado do tipo porfirina-calcona **28f** em CDCl_3 .

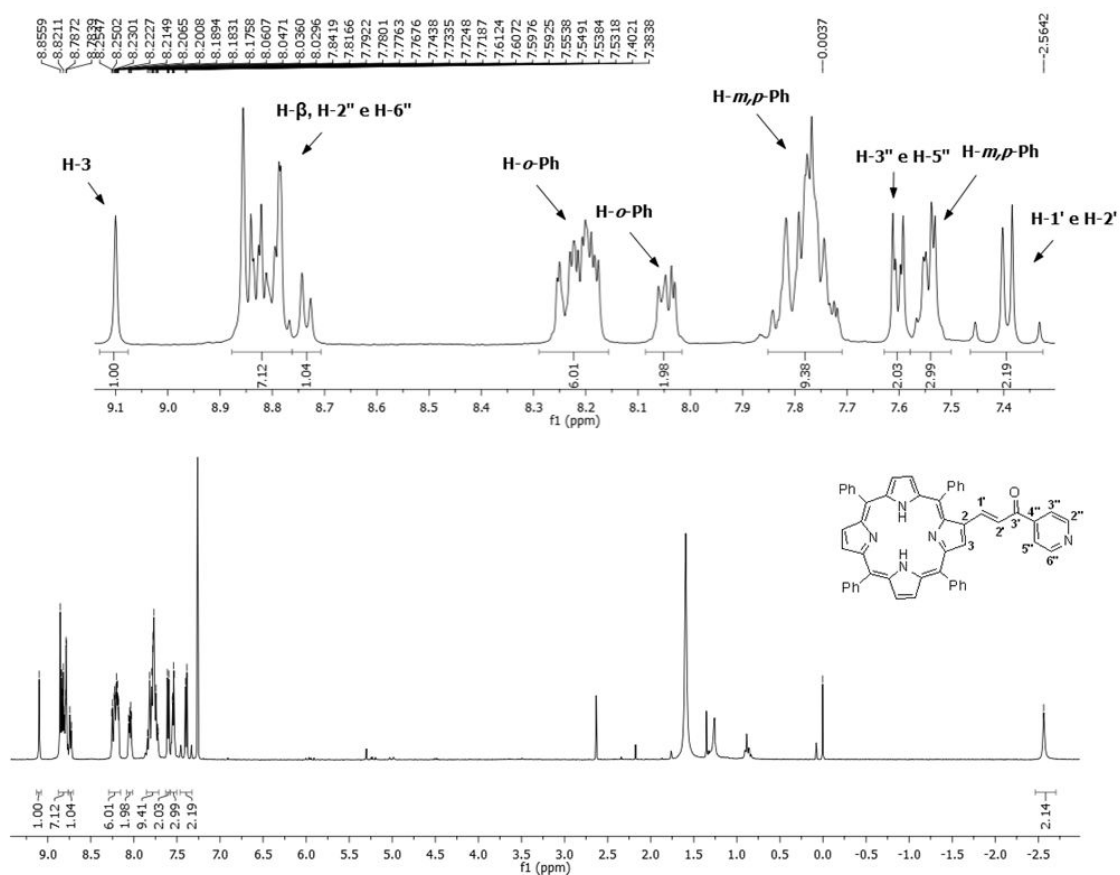


Anexo 8. Expansões do espectro de HMBC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado do tipo porfirina-calcona **28f** em CDCl_3 .

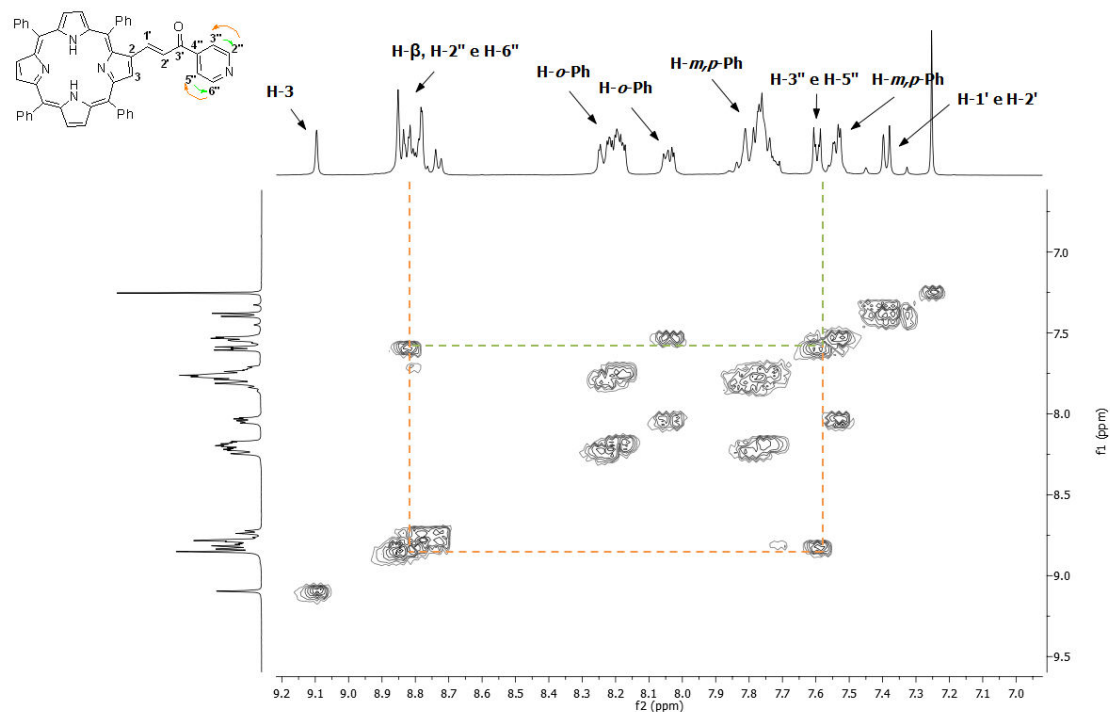




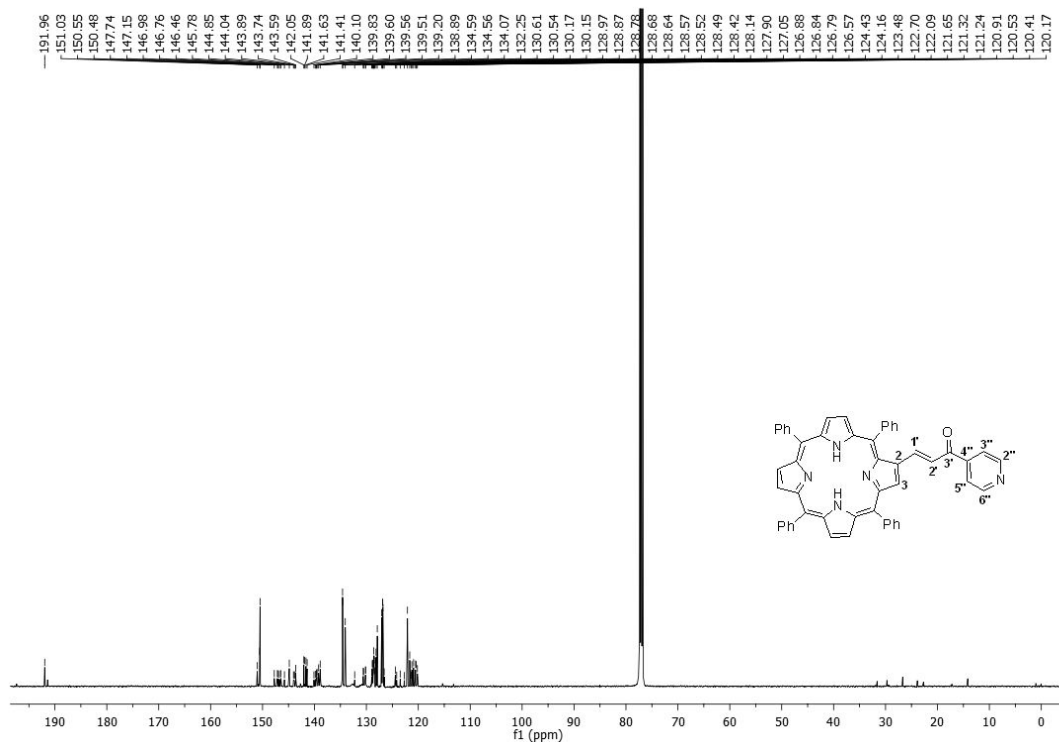
Anexo 9. Espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-calcona **28g** em CDCl_3 .



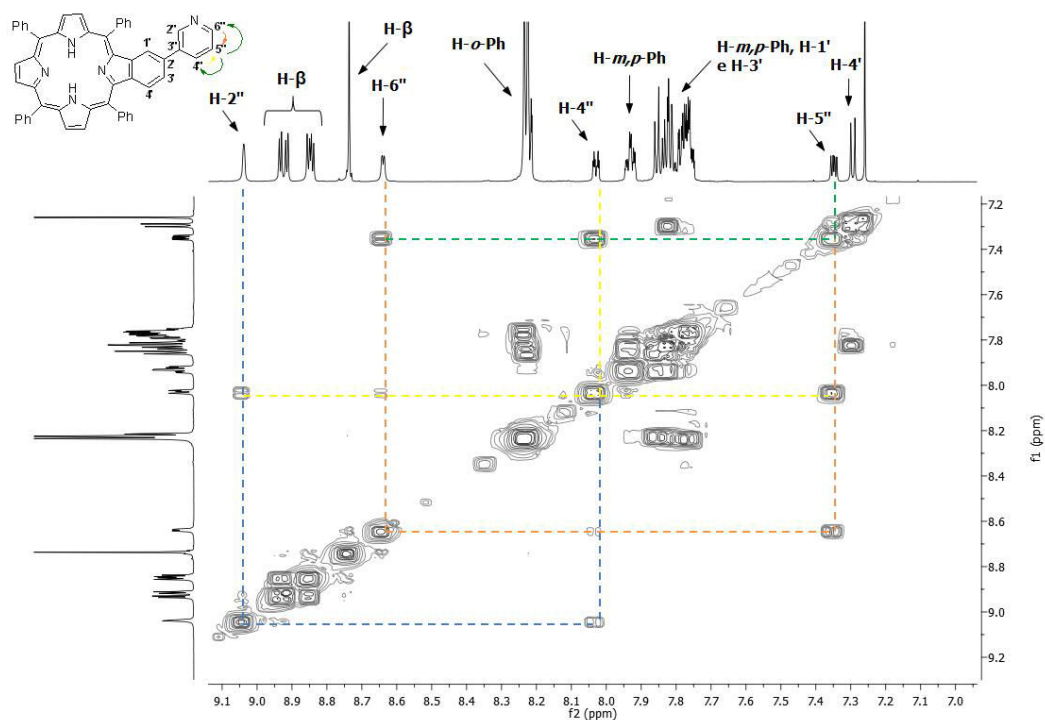
Anexo 10. Expansão do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do derivado porfirina-calcona **28g** em CDCl_3 .



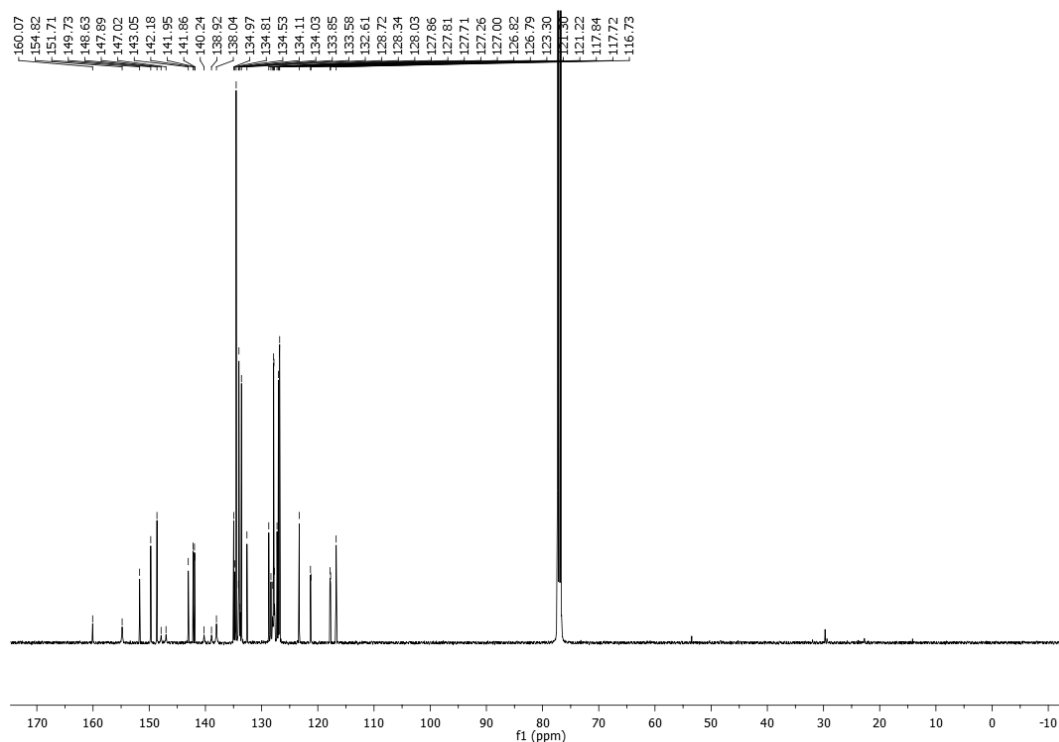
Anexo 11. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado do tipo porfirina-calcona **28g** em CDCl_3 .



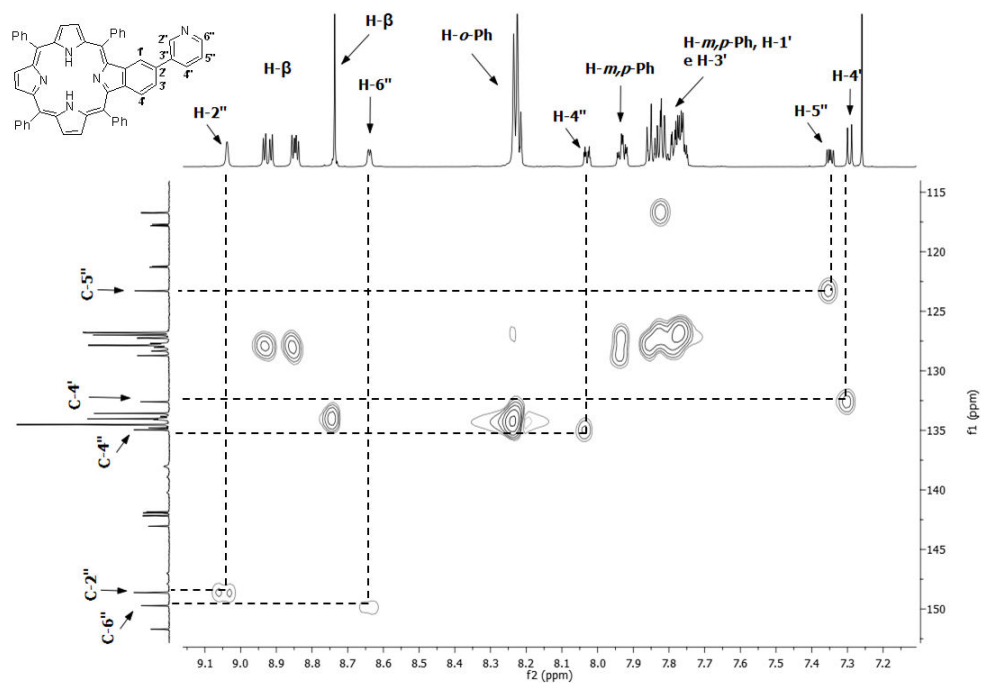
Anexo 12. Expansão do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do derivado benzoporfirínico **29f** em CDCl_3



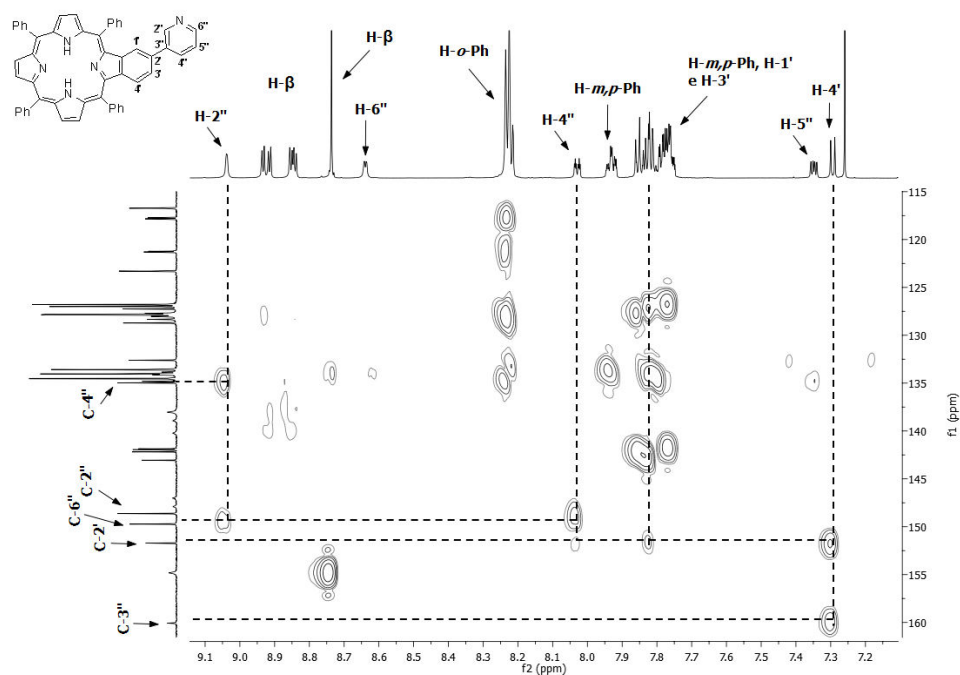
Anexo 13. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado benzoporfirínico **29f** em CDCl_3 .



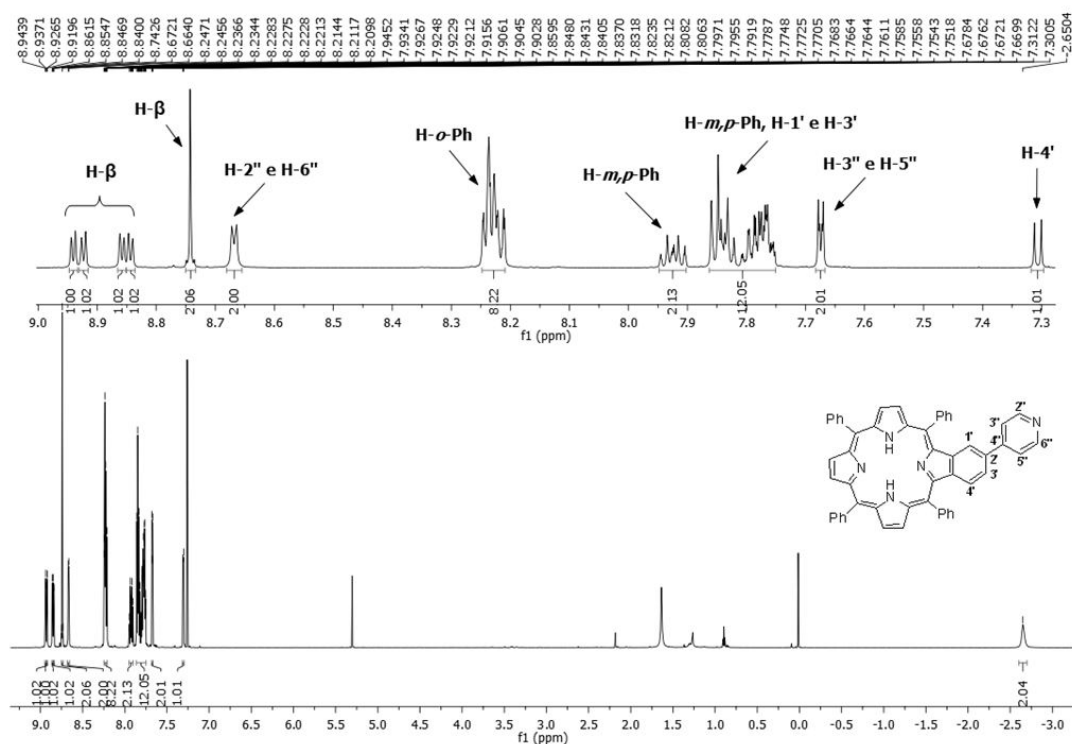
Anexo 14. Expansão do espectro de HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado benzoporfirínico **29f** em CDCl_3 .



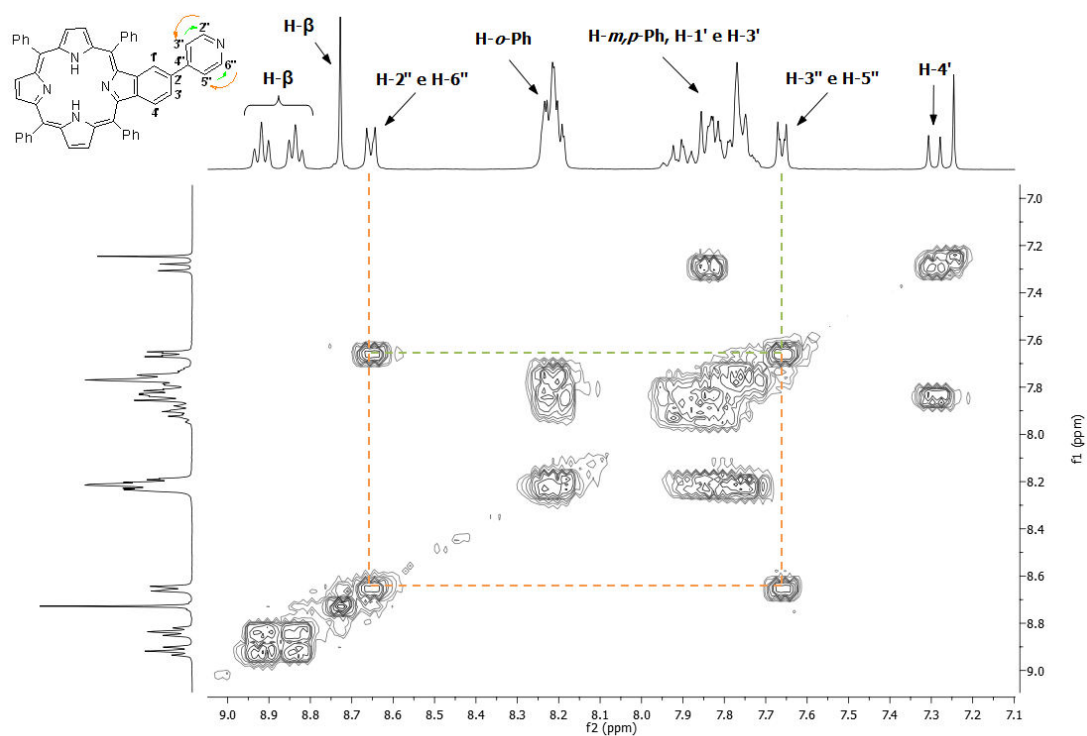
Anexo 15. Expansão do espectro de HMBC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado benzoporfirínico **29f** em CDCl_3 .



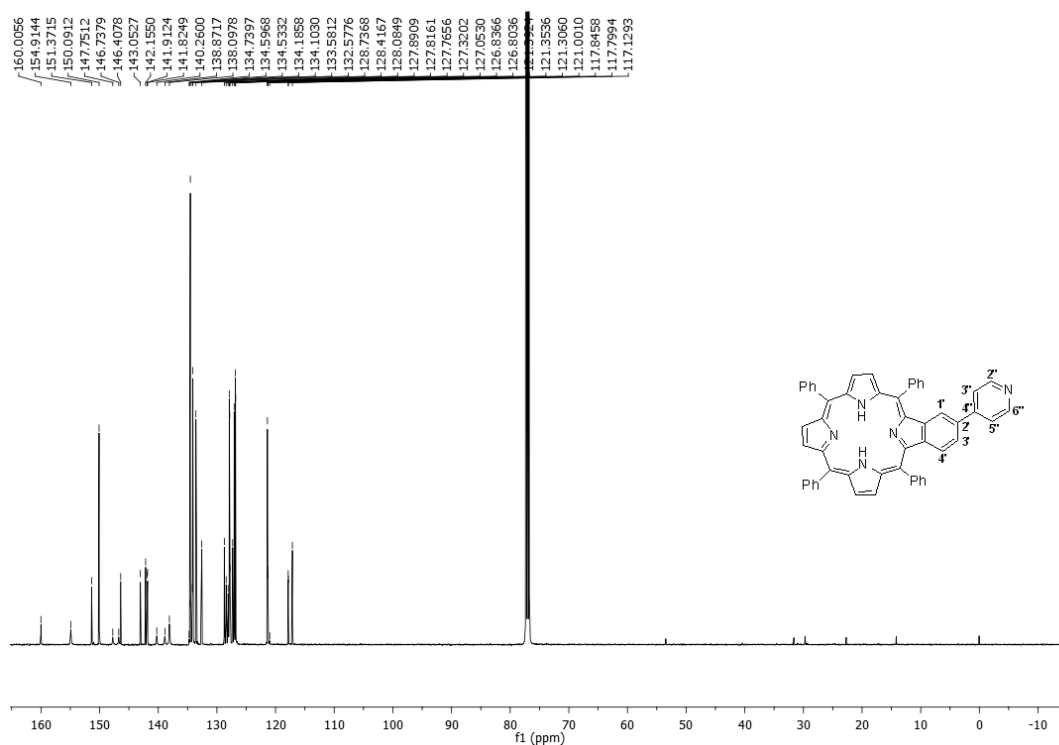
Anexo 16. Espetro de RMN de ^1H do derivado benzoporfirínico **29g** em CDCl_3 .



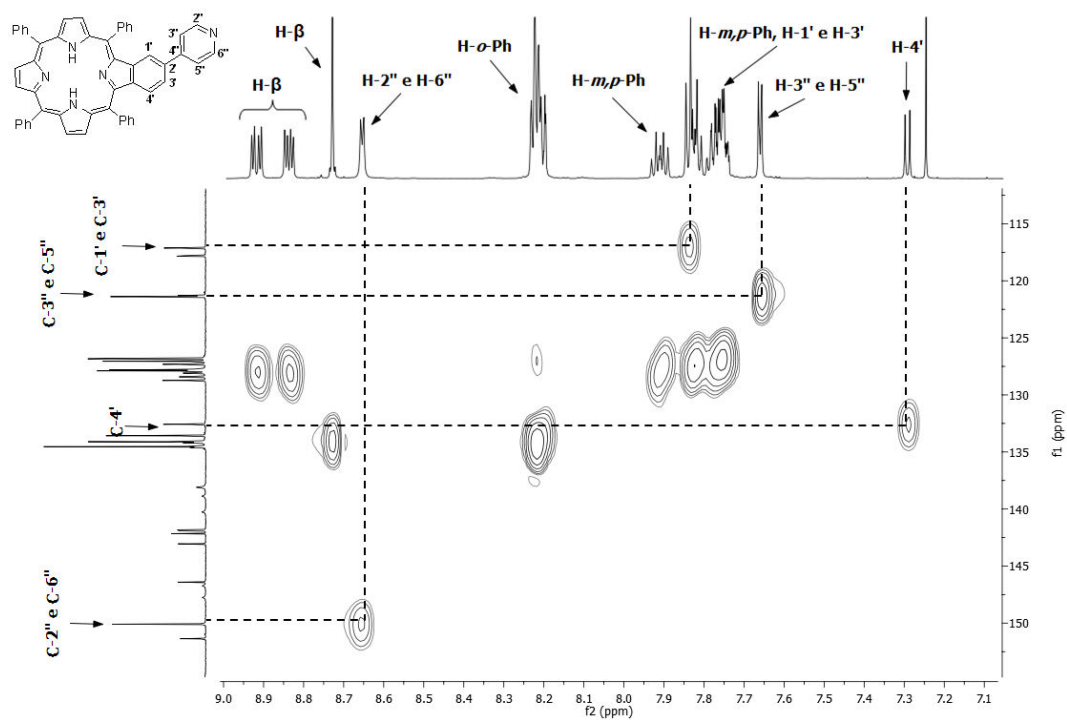
Anexo 17. Expansão do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do derivado benzoporfirínico **29g** em CDCl_3 .



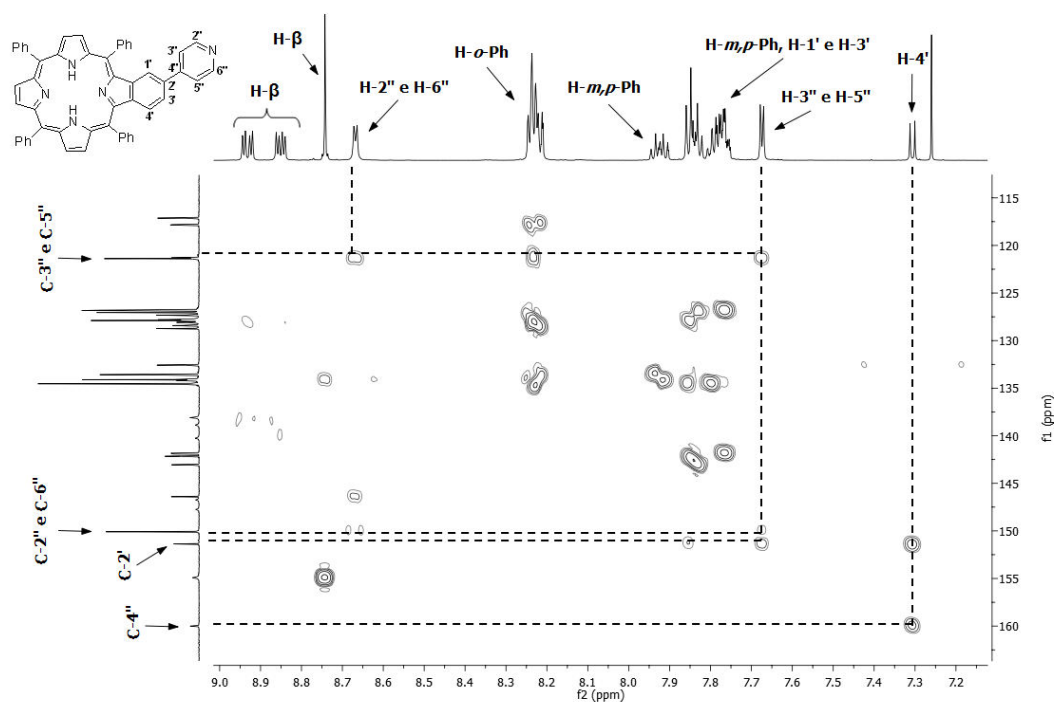
Anexo 18. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado benzoporfirínico **29g** em CDCl_3 .



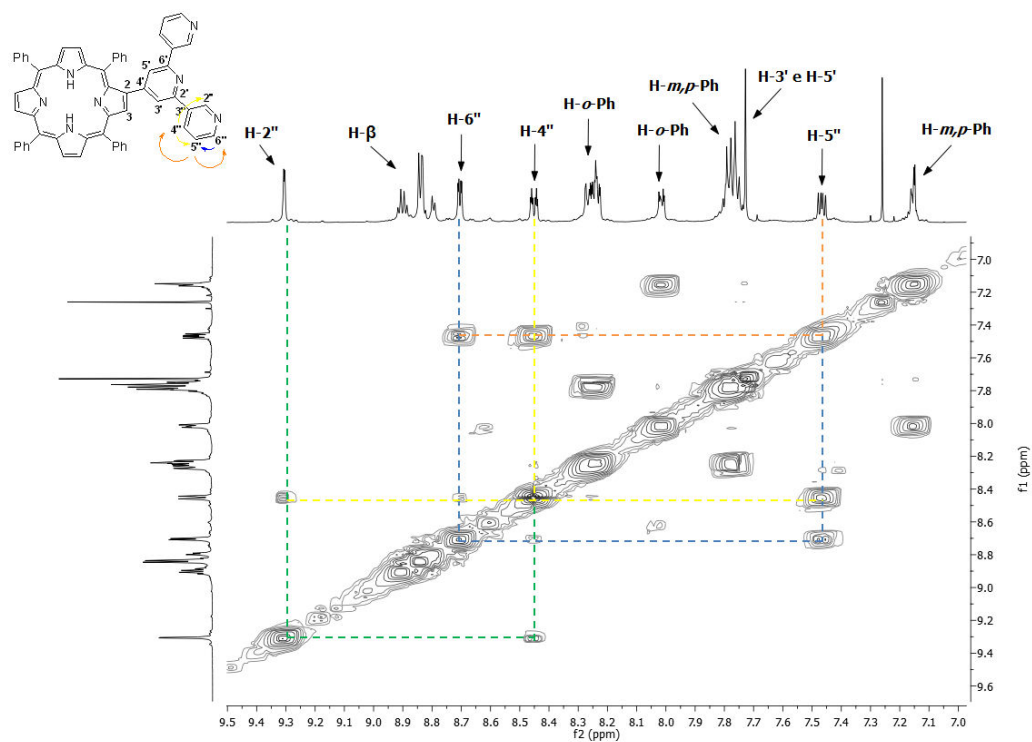
Anexo 19. Expansão do espectro de HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado benzoporfirínico **29g** em CDCl_3 .



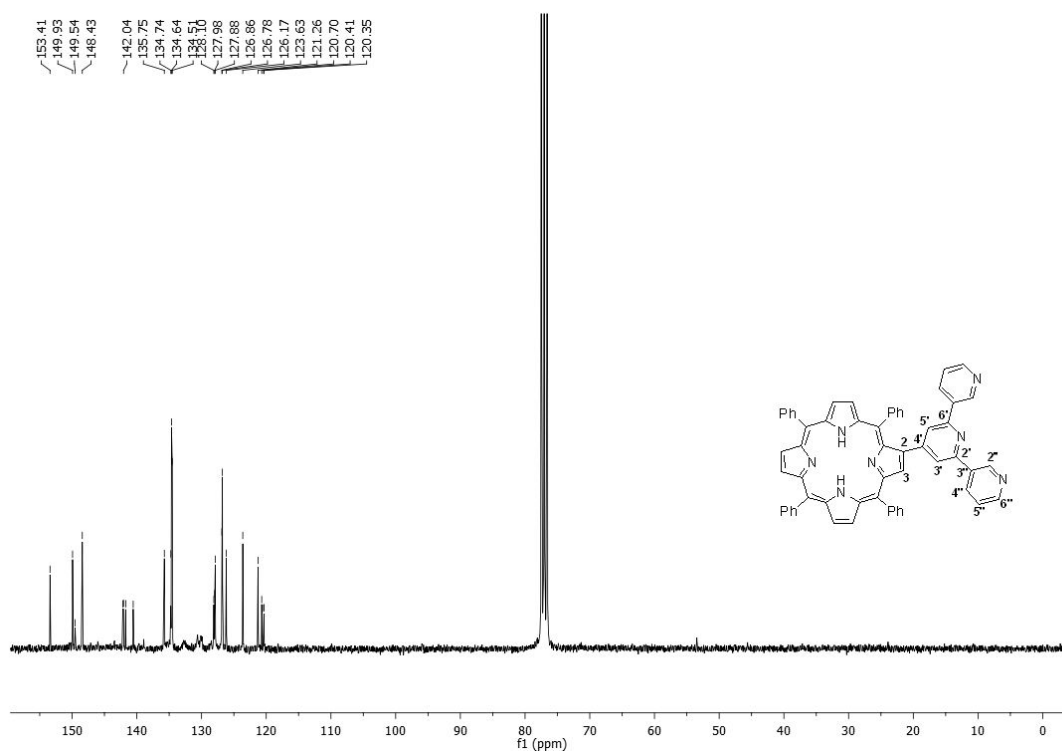
Anexo 20. Expansão do espectro de HMBC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado benzoporfirínico **29g** em CDCl_3 .



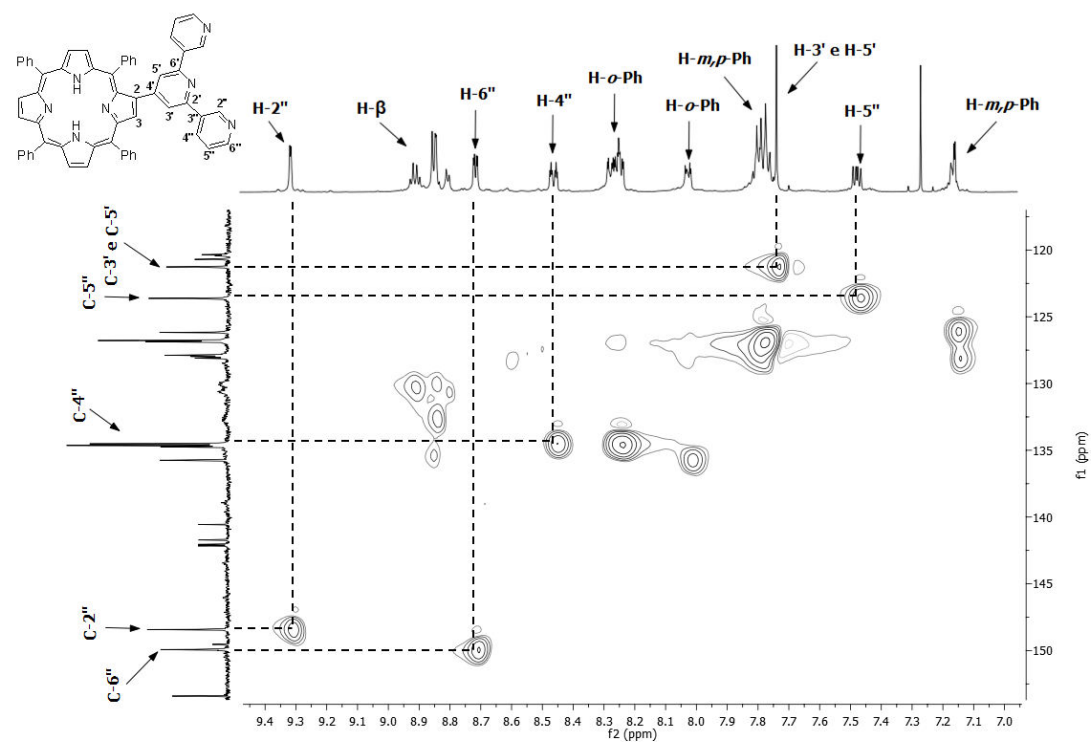
Anexo 21. Expansão do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do derivado do tipo porfirina-piridina **30f** em CDCl_3 .



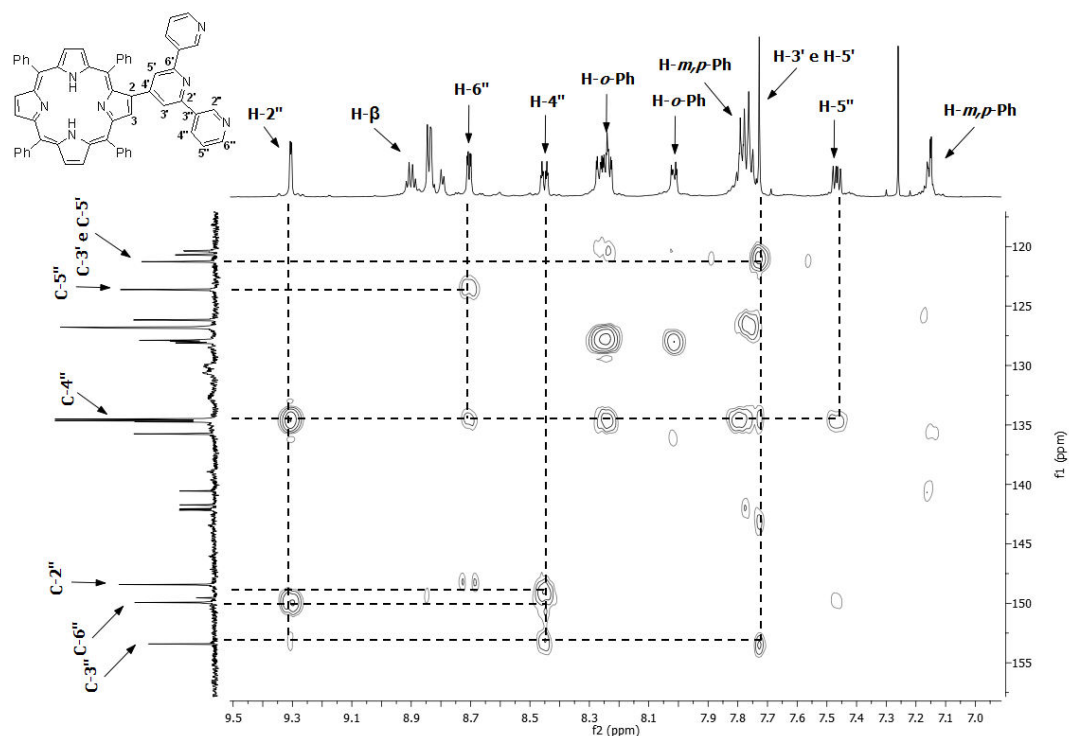
Anexo 22. Espetro de RMN de ^{13}C do derivado do tipo porfirina-piridina **30f** em CDCl_3 .



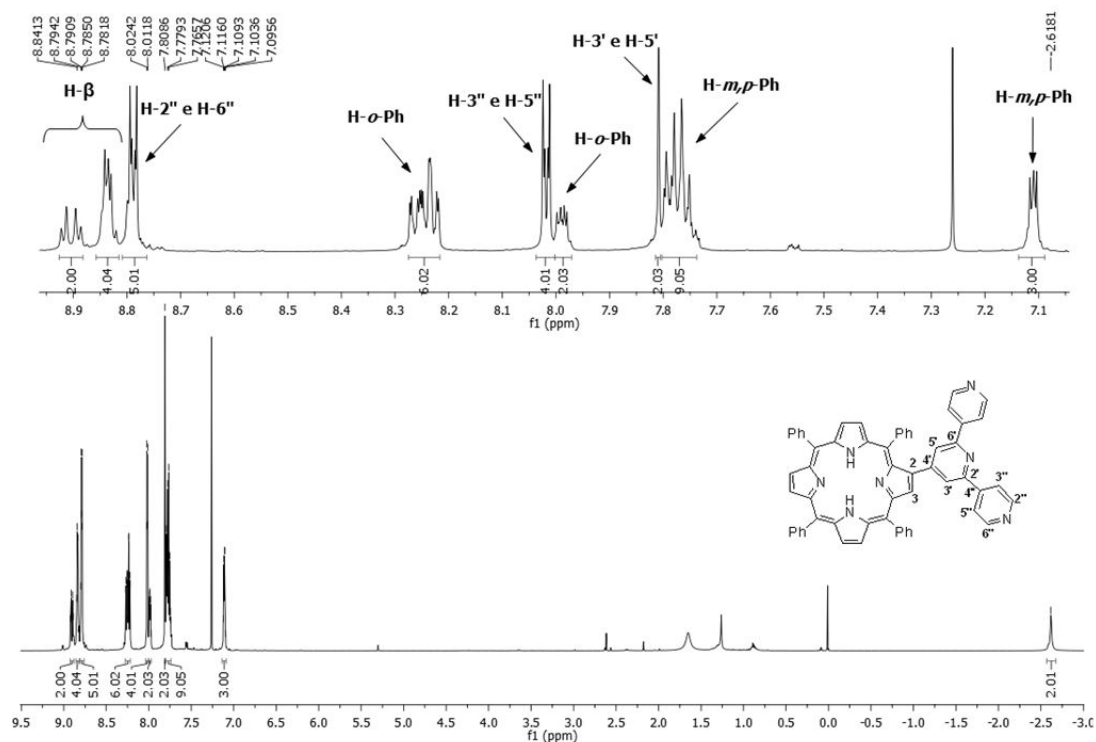
Anexo 23. Expansão do espectro de HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado do tipo porfirina-piridina **30f** em CDCl_3 .



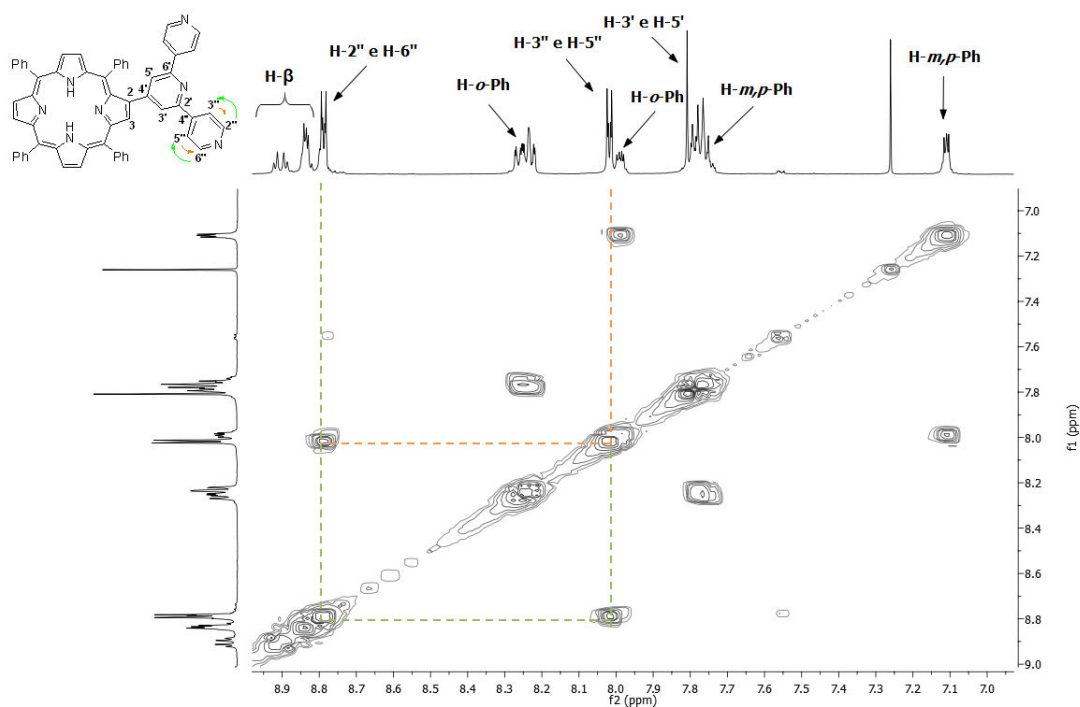
Anexo 24. Expansão do espectro de HMBC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado do tipo porfirina-piridina **30f** em CDCl_3 .



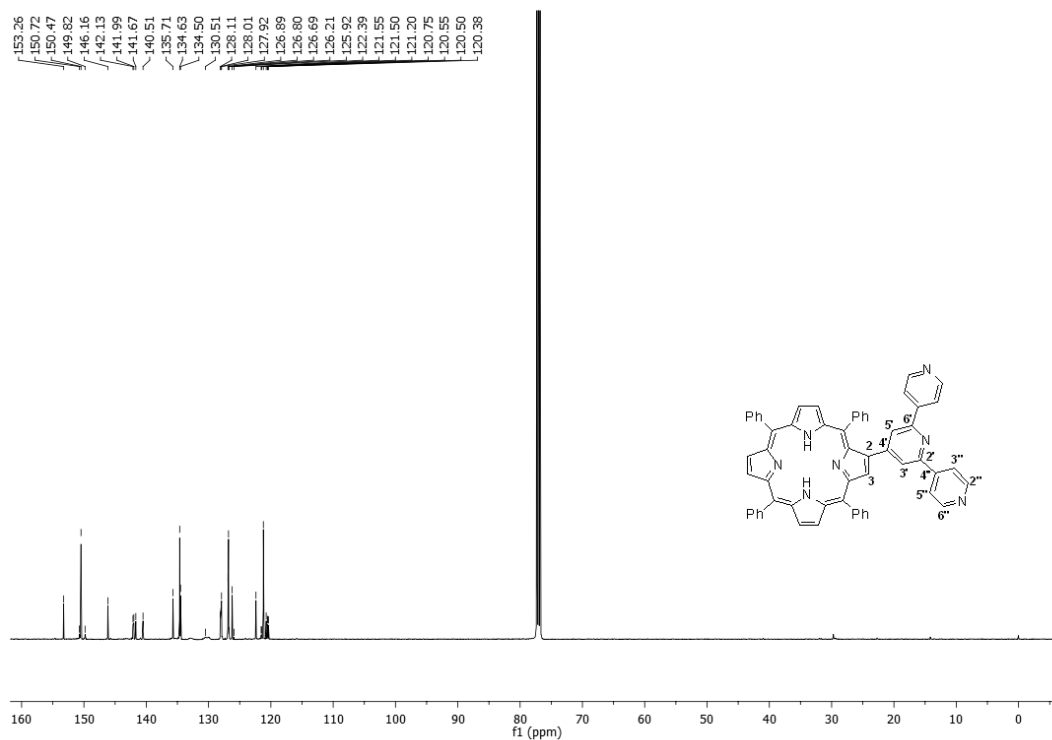
Anexo 25. Espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-piridina **30g** em CDCl_3



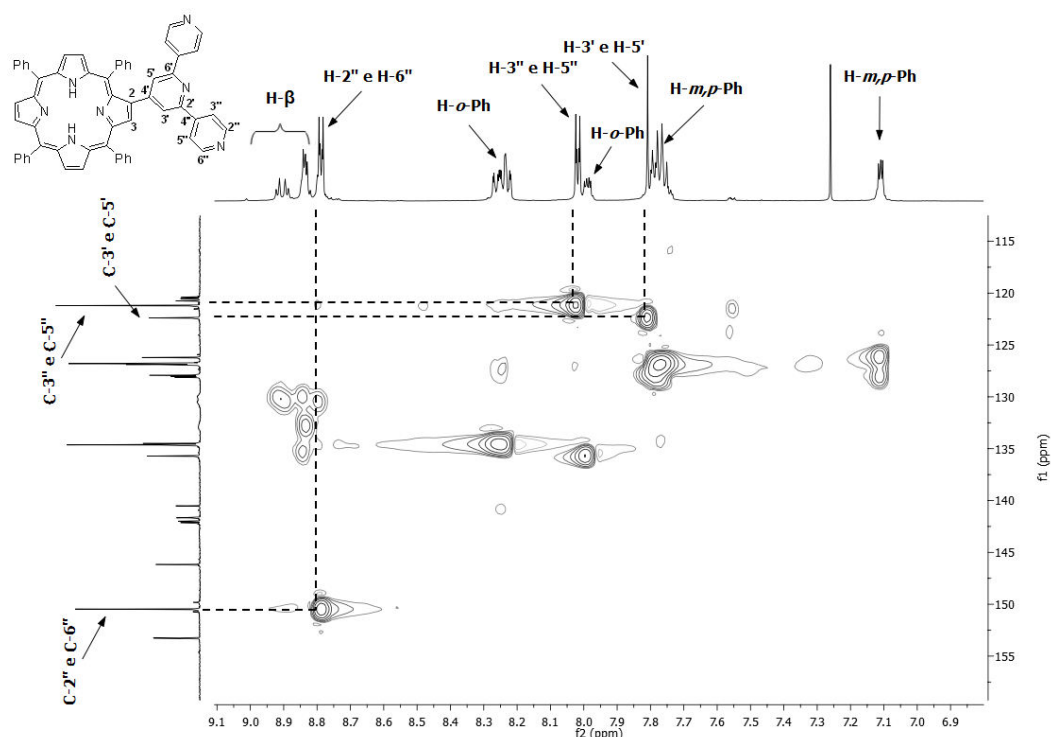
Anexo 26. Expansão do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do derivado do tipo porfirina-piridina **30g** em CDCl_3 .



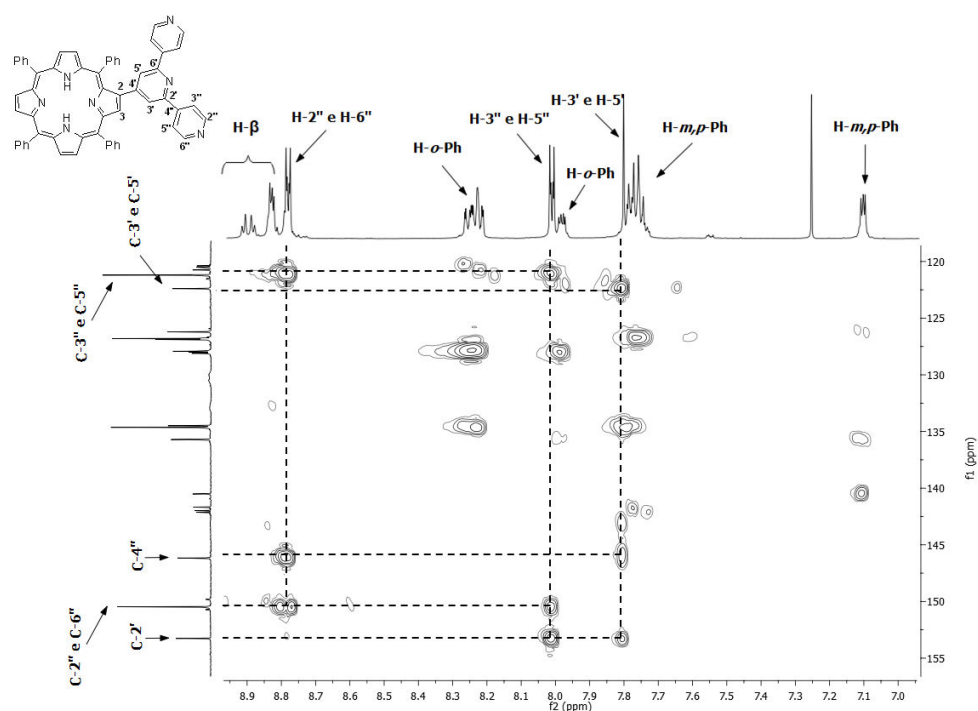
Anexo 27. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado do tipo porfirina-piridina **30g** em CDCl_3 .



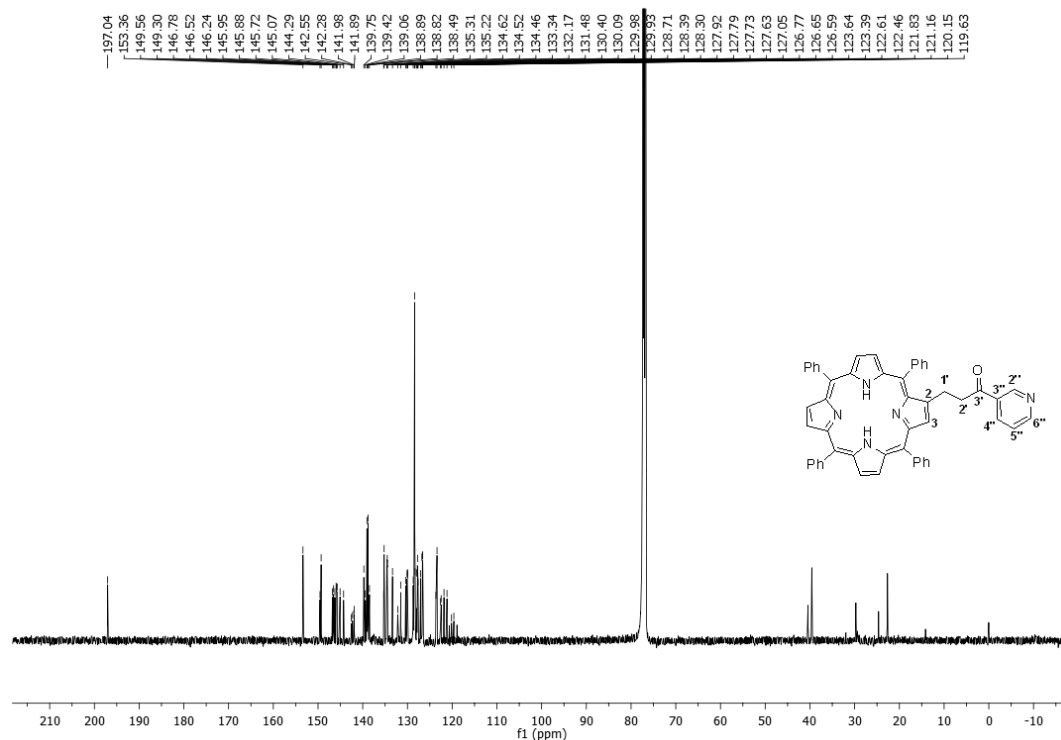
Anexo 28. Expansão do espectro de HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado do tipo porfirina-piridina **30g** em CDCl_3 .



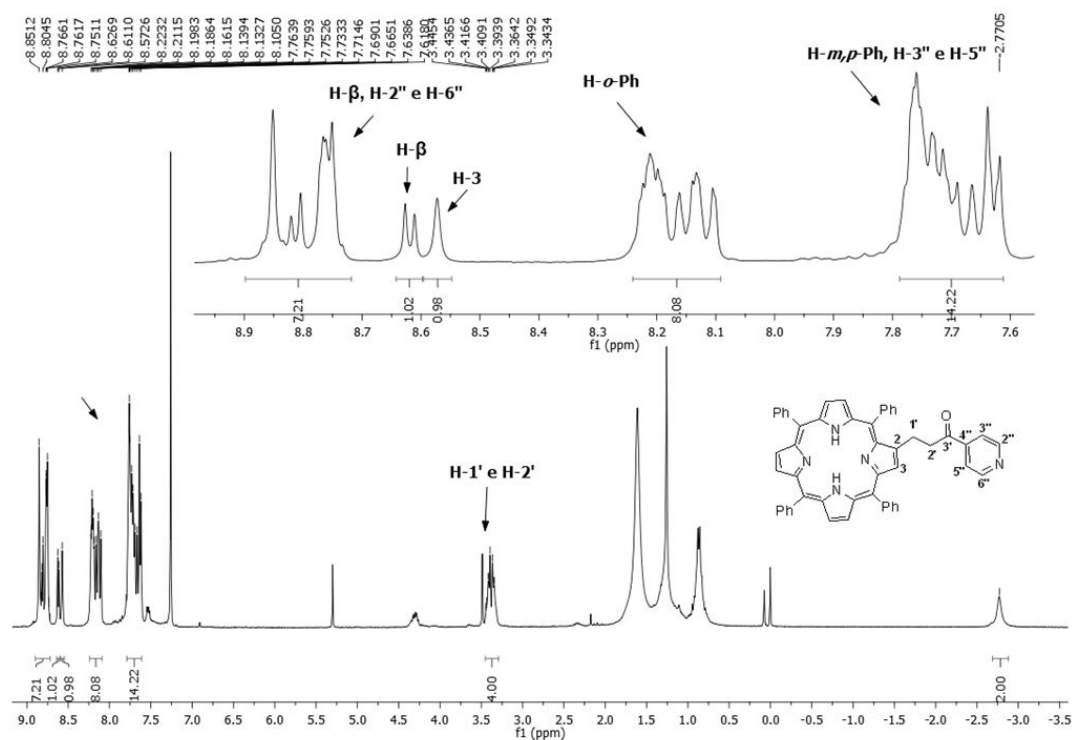
Anexo 29. Expansão do espectro de HMBC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado do tipo porfirina-piridina **30g** em CDCl_3 .



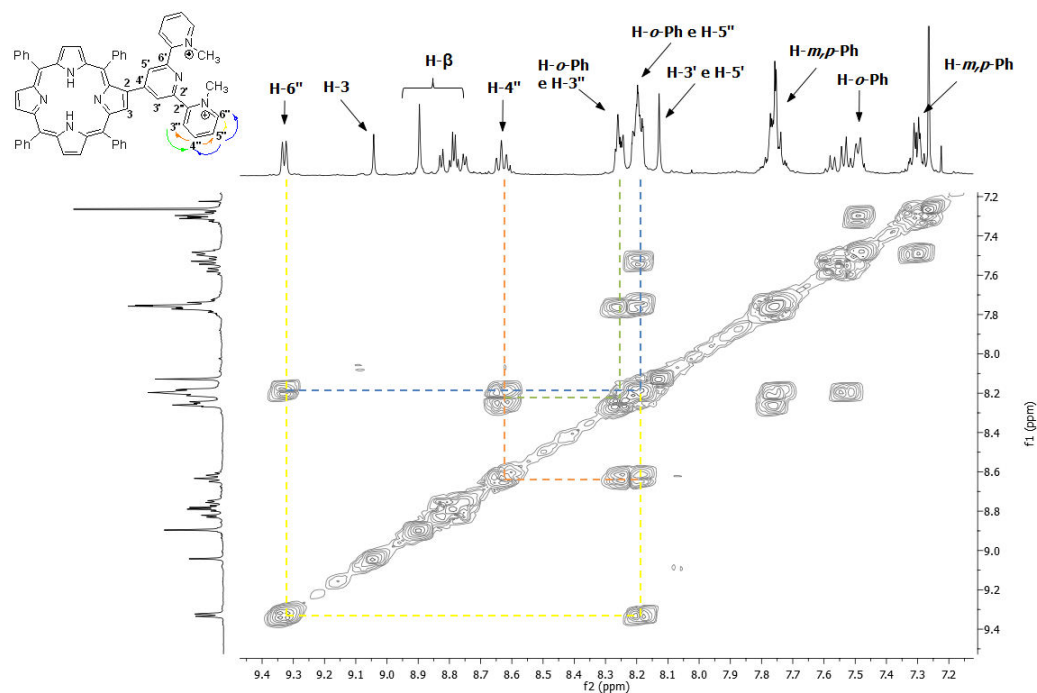
Anexo 30. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado do tipo porfirina-calcona reduzido **33f** em CDCl_3 .



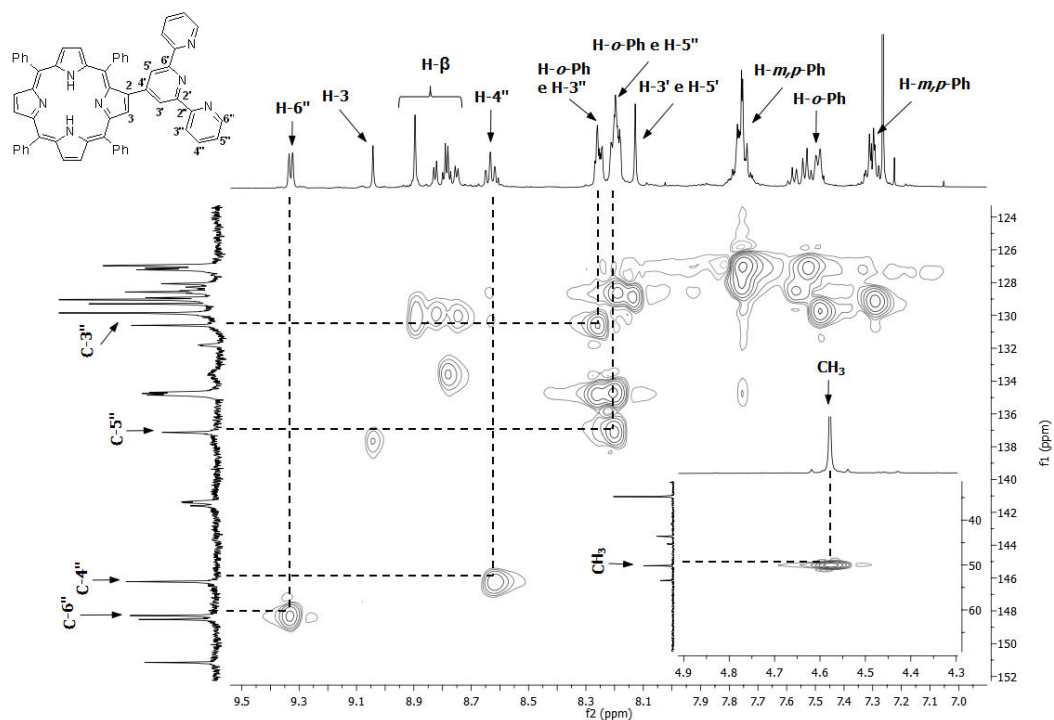
Anexo 31. Espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-calcona reduzido **33g** em CDCl_3 .



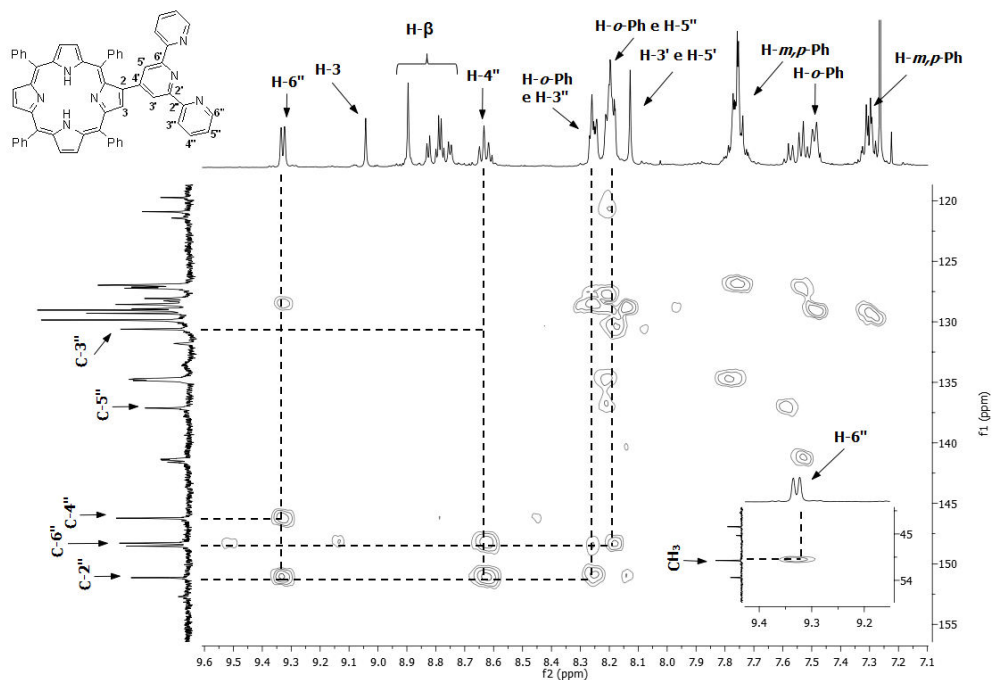
Anexo 32. Expansão do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do derivado do tipo porfirina-piridina catiónico **34e** em $\text{CDCl}_3/\text{MeOH D}_4$.



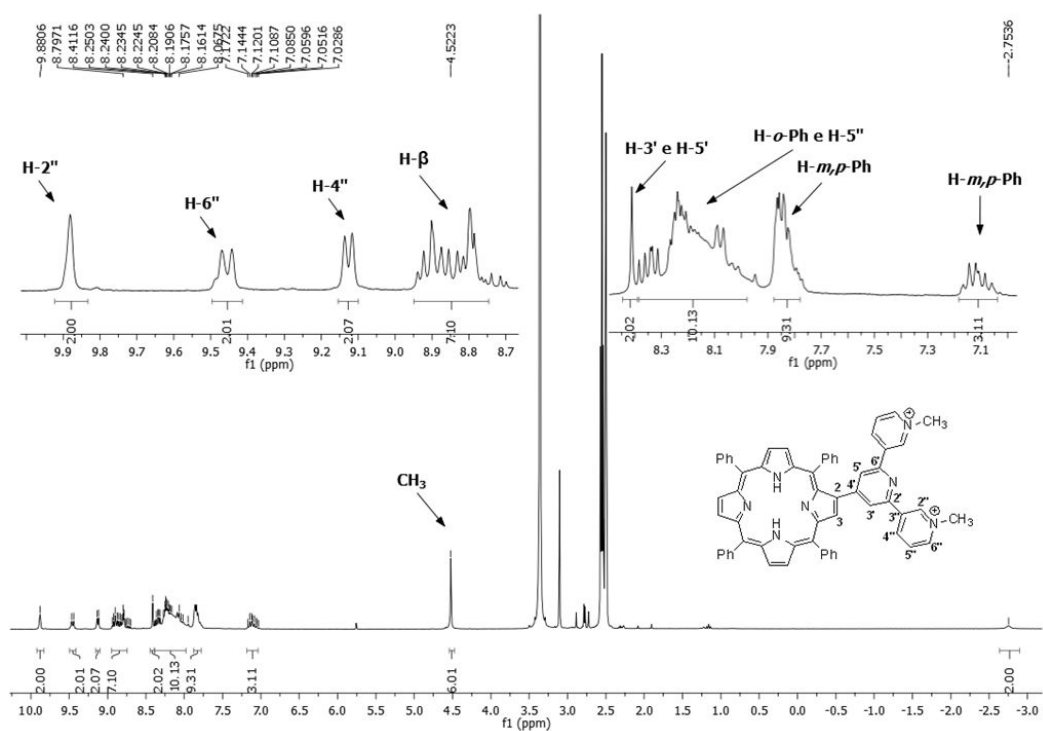
Anexo 33. Expansão do espectro de HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado do tipo porfirina-piridina catiónico **34e** em $\text{CDCl}_3/\text{MeOH D}_4$.

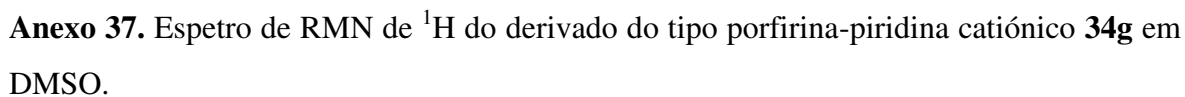


Anexo 34. Expansão do espectro de HMBC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do derivado do tipo porfirina-piridina catiónico **34e** em $\text{CDCl}_3/\text{MeOH D}_4$.



Anexo 35. Espectro de RMN de ^1H do derivado do tipo porfirina-piridina catiónico **34f** em DMSO.





Anexo 38. Expansão do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do derivado do tipo porfirina-piridina catiónico **34g** em DMSO.

